

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Filip Wichterle

**Studium hepatoprotektivního potenciálu modulátorů NAD^+ -
dependentní deacetylasy sirtuinu-1 a proteinkinasy
aktivované AMP na experimentálních modelech
hepatocytárního poškození**

Study of hepatoprotective potential of NAD^+ -dependent
deacetylase sirtuin-1 and AMP-activated protein kinase
modulators in experimental models of hepatocyte damage

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Konzultant: MUDr. Nikolína Kutinová Canová, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Abstrakt

Sirtuin 1 (SIRT1) a proteinkinasa aktivovaná adenosinmonofosfátem (AMPK) jsou spojeny s řadou hepatoprotektivních účinků, nicméně jejich protektivní role v oblasti lékového poškození jater dosud není zcela objasněna. Možná souvislost mezi účinky SIRT1 a AMPK byla spekulována, ale rovněž není známá.

Cílem této práce bylo zkoumání vlivu modulátorů obou enzymů na jejich potenciální hepatoprotektivní účinky a studium jejich případného vzájemného vztahu. Pro tyto účely byl využit potkaní model hepatocytárního poškození indukovaného paracetamolem. Po kultivaci primárních kultur hepatocytů s roztoky CAY10591 (aktivátor SIRT1) a AICAR (aktivátor AMPK) byla stanovena buněčná viabilita pomocí MTT testu, aktivita ALT a aktivita SIRT1. CAY10591 i AICAR zmírnily hepatotoxicitu indukovanou paracetamolem. Aktivovaná AMPK nezvýšila aktivitu SIRT1.

Výsledky naznačují, že CAY10591 a AICAR hrají protektivní roli v oblasti lékového poškození jater. Účinky CAY10591 jsou zřejmě spojené s aktivací SIRT1. AICAR působil hepatoprotektivně prostřednictvím AMPK. Byla vyloučena vedlejší aktivace SIRT1 pomocí AMPK. Vztah mezi SIRT1 a AMPK se nepodařilo prokázat a zaslouží si další studium.

Klíčová slova

SIRT1, AMPK, hepatotoxicita, paracetamol

Abstract

Sirtuin 1 (SIRT1) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) are associated with several hepatoprotective effects, however their potential protective role in drug-induced liver injury has not yet been fully elucidated. The possible connection between the effects of SIRT1 and AMPK was speculated but remains generally unknown.

The aim of this work was to investigate the effect of modulators of both enzymes on their potential hepatoprotective effects and to study their possible mutual relationship. For these purposes, a rat model of acetaminophen-induced hepatocyte damage was used. Primary cultures of hepatocytes were exposed to solutions of CAY10591 (activator of SIRT1) and AICAR (activator of AMPK). Subsequently, cellular viability by MTT assay, ALT activity, and SIRT1 activity were determined. Both CAY10591 and AICAR alleviated acetaminophen induced hepatotoxicity. Activated AMPK did not increase the activity of SIRT1.

The results indicate that CAY10591 and AICAR play a protective role in drug-induced liver injury. The effects of CAY10591 appear to be associated with SIRT1 activation. The effect of AICAR was due to hepatoprotective effect of AMPK. Collateral activation of SIRT1 by AMPK was excluded. The relationship between SIRT1 and AMPK has not been demonstrated and deserves further investigation.

Key words

SIRT1, AMPK, hepatotoxicity, acetaminophen

[IN CZECH]

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval MUDr. Nikolině Kutinové Canové, Ph.D. za její vstřícnost a pomoc při přípravě a provádění experimentů. Dále bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za jeho cenné rady a odborné vedení této práce.

Obsah

<i>Seznam použitých zkratk</i>	7
1 Literární přehled	11
1.1 Játra	12
1.1.1 Makroanatomie jater	12
1.1.2 Mikroanatomie jater.....	12
1.1.3 Funkce jater	16
1.1.4 Biochemická vyšetření jater.....	16
1.2 Biotransformace xenobiotik	18
1.2.1 I. fáze biotransformace	18
1.2.2 II. fáze biotransformace	19
1.2.3 Metabolismus paracetamolu	20
1.3 Hepatoprotektivní mechanismy	22
1.3.1 NAD ⁺ -dependentní deacetylase sirtuin-1	22
1.3.2 Proteinkinasa aktivovaná AMP	27
2 Cíl práce	31
3 Materiál a metody	33
3.1 Použité chemikálie	33
3.2 Použité přístroje a pomůcky	33
3.3 Použité metody	34
3.3.1 Kultivace hepatocytů	35
3.3.2 Zpracování hepatocytů.....	37
3.3.3 Stanovení viability hepatocytů.....	38
3.3.4 Stanovení aktivity ALT	38
3.3.5 Stanovení koncentrace ALT	39
3.3.6 Stanovení aktivity SIRT1	40
3.3.7 Stanovení koncentrace proteinů	42
4 Výsledky	45
4.1 Stanovení viability hepatocytů	45
4.2 Stanovení aktivity ALT	47
4.3 Stanovení koncentrace ALT	48
4.4 Stanovení aktivity SIRT1	49
5 Diskuze	53
6 Souhrn	57
<i>Seznam použité literatury</i>	58

Seznam použitých zkratk

6-WP	6jamková mikrotitrační destička (z angl. <i>6-well plate</i>)
24-WP	24jamková mikrotitrační destička (z angl. <i>24-well plate</i>)
96-WP	96jamková mikrotitrační destička (z angl. <i>96-well plate</i>)
α -RIM	motiv interagující s regulační podjednotkou (z angl. <i>regulatory subunit-interacting motif</i>)
ACC	acetyl-CoA-karboxylasa
ADaM	allosterické místo AMPK vázající léčiva a jejich metabolity (z angl. <i>allosteric drug and metabolite</i>)
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid
AID	autoinhibiční doména (z angl. <i>autoinhibitory domain</i>)
AIF	faktor indukující apoptózu (z angl. <i>apoptosis-inducing factor</i>)
ALT	alaninaminotransferasa
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	proteinkinasa aktivovaná AMP (z angl. <i>AMP-activated protein kinase</i>)
APAP	paracetamol (z angl. <i>N-acetyl-p-aminophenol</i>)
ARE	antioxidační responzivní element (z angl. <i>antioxidant responsive element</i>)
AST	aspartátaminotransferasa
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumine</i>)
CBS	doména vázající ligandy obsahující adenosin, nazývaná podle cystathion- β -synthasy
CC	dorsomorfín (z angl. <i>compound C</i>)
CMB	doména vázající sacharid (z angl. <i>carbohydrate-binding module</i>)
CPT	karnitinpalmitoyltransferasa
CREB	protein vázající cAMP responzivní elementy (z angl. <i>cAMP response element-binding protein</i>)
CRTC2	transkripční koaktivátor 2 regulovaný pomocí CREB (z angl. <i>CREB-regulated transcription coactivator 2</i>)
CTR	C-terminální regulační segment (z angl. <i>C-terminal regulatory segment</i>)
CYP	monooxygenasy systému cytochromu P450

DAMP	molekulární vzory asociované s poškozením (z angl. <i>damage associated molecular patterns</i>)
DILI	lékové poškození jater (z angl. <i>drug-induced liver injury</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EGCG	epigallokatechin-3-gallát
ELISA	„enzyme-linked immuno sorbent assay“
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. <i>fetal bovine serum</i>)
FMO	flavinové monooxygenasy
FOXO	„Forkhead box protein O“
GADD45	„growth arrest and DNA damage-inducible protein“
GGT	gama-glutamyltransferasa
GSH	glutathion
GST	glutathion- <i>S</i> -transferasa
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová
HNF4	hepatocytární jaderný faktor 4 (z angl. <i>hepatocyte nuclear factor 4</i>)
IDO	indolamin-2,3-dioxygenasa
JNK	c-Jun N-terminální kinasa
KD	N-terminální kinasová doména (z angl. <i>N-terminal kinase domain</i>)
Keap1	„Kelch-like ECH-associated protein 1“
LD	laktátdehydrogenasa
LKB1	jaterní kinasa B1 (z angl. <i>liver kinase B1</i>)
MPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti (z angl. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná forma)
NAFLD	nealkoholická jaterní steatóza (z angl. <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NAMPT	nikotinamidfosforibosyltransferasa
NAPQI	<i>N</i> -acetyl-p-benzochinon imin
NASH	nealkoholická steatohepatida (z angl. <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>)
NMNAT	nikotinamidmononukleotidadenylyltransferasa
Nrf2	„nuclear factor erythroid 2-related factor 2“

PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PBS	fosfátový pufr (z angl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PGC-1 α	„PPAR gamma coactivator 1 alpha“
PM	Petriho miska
PPAR	„peroxisome proliferator-activated receptor“
RFU	relativní fluorescenční jednotka (z angl. <i>relative fluorescence unit</i>)
RIPA	„radioimmunoprecipitation assay buffer“
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
SBD	doména vázající STAC (z angl. <i>STAC-binding domain</i>)
SIRT1	NAD ⁺ -dependentní deacetylasa sirtuin-1
STAC	sloučenina aktivující SIRT1 (z angl. <i>SIRT1-activating compound</i>)
TLR	receptor podobný genu Toll (z angl. <i>Toll-like receptor</i>)
TMB	tetramethylbenzidin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa

1 Literární přehled

Jaterní onemocnění představují značný celosvětový zdravotní problém a řada z nich je ovlivněna faktory jako nadměrná konzumace alkoholu, virové infekce, nadměrné užívání léčiv, cholestatické poruchy nebo dědičné metabolické poruchy.¹ Epidemie obezity přispívá k rozvoji nealkoholické jaterní steatózy (z angl. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), která zahrnuje prosté ztukovatění jater (tj. jaterní steatózu), nealkoholickou steatohepatidu (z angl. *non-alcoholic steatohepatitis*, NASH), fibrózu, jaterní cirhózu a eventuálně rozvoj hepatocelulárního karcinomu.²

Lékové poškození jater (z angl. *drug-induced liver injury*, DILI) je hlavní příčinou jaterní dysfunkce ve Spojených státech a v Evropě. Hepatotoxicita je nejčastějším důvodem selhání vývoje léčiv, a pro zvýšení jejich dostupnosti jsou proto klíčové nové postupy cílené na zmírnění DILI. Preklinické modely DILI *in vivo* a *in vitro* jsou cennými nástroji pro identifikaci molekulárních mechanismů zodpovědných za buněčnou smrt a genů zodpovědných za náchylnost vůči DILI.³ Jaterní poškození indukované paracetamolem se běžně využívá jako standardní model DILI pro testování hepatoprotektivních vlastností přírodních sloučenin a léčiv.⁴

K hepatoprotektivním účinkům těchto látek při DILI by mohla přispívat zvýšená aktivita NAD^+ -dependentní deacetylasy sirtuinu-1 (sirtuin 1, SIRT1) a proteinkiny aktivované AMP (z angl. *AMP-activated protein kinase*, AMPK). Pomocí SIRT1 buňka reguluje rozsah zánětu a oxidativního stresu, které patří mezi hlavní zprostředkovatele hepatocytárního poškození.⁵ Zmírnění oxidativního stresu je mimo jiné dosaženo součinností SIRT1 a jednoho z jeho nepřímých molekulárních cílů AMPK.^{6,7}

Spolu se SIRT1 se AMPK podílí na regulaci buněčného energetického metabolismu, zánětlivé odpovědi a mitochondriální funkce. Role AMPK spočívá především v monitorování koncentračního poměru AMP/ATP, resp. ADP/ATP. Stimulace AMPK potlačuje lipogenní dráhy, vede k aktivaci β -oxidace mastných kyselin a zvyšuje citlivost na insulin. Nárůstem koncentrace NAD^+ zvyšuje AMPK aktivitu SIRT1, a naopak SIRT1 může opět nepřímo aktivovat AMPK svojí deacetylasovou aktivitou.⁸ V neposlední řadě je upregulace SIRT1 a AMPK silně spojená s hepatoprotektivními účinky^{6,9-12} a potenciální dráha SIRT1/AMPK tak představuje atraktivní terapeutický cíl. Studium modulátorů SIRT1 a AMPK by tedy mohlo přispět k vývoji nových strategií v oblasti DILI.

1.1 Játro

Játro jsou metabolicky aktivní orgán s širokou škálou funkcí, který hraje zásadní roli v biotransformaci endogenních a exogenních látek. Jejich vystavení působení léčiv může vést přes nespecifické symptomy až k akutnímu selhání jater.¹³

1.1.1 Makroanatomie jater

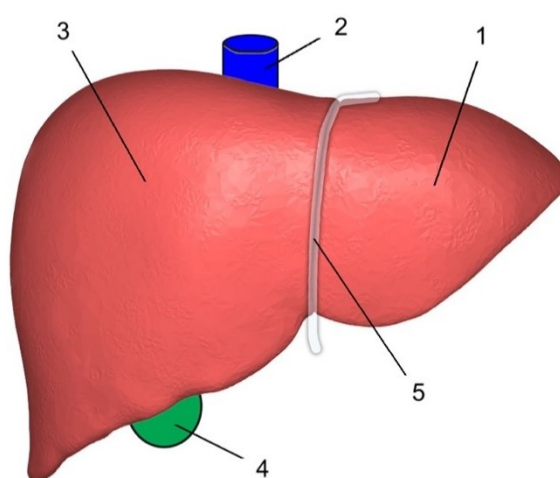
Játro jsou pružný a křehký orgán hnědočervené barvy,¹⁴ váží průměrně 1500 g a jsou největší žlázou lidského těla.¹⁵ Nachází se v břišní dutině, přičemž zaujímají většinu pravého podžebří a přesahují přibližně až do střední části levého podžebří.¹⁶ Jsou převážně kryta pobřišnicí a jejich horní brániční plocha volně naléhá na bránici. Výjimku tvoří vazovitý pruh (*ligamentum falciforme*), kterým jsou játra pevně uchycena k přední stěně břišní, a který brániční plochu anatomicky dělí na levý a pravý lalok (obr. 1.1, str. 13). Dolní viscerální plocha je obrácená k orgánům břišní dutiny, které jí způsobují charakteristické otisky. Na této straně je zároveň umístěná jaterní brána, která představuje vstup jaterní tepny a portální žíly, výstup levého a pravého jaterního vývodu, a která vytváří rozhraní mezi čtyřhranným a ocasatým lalokem (obr. 1.2, str. 13). Toto dělení však odpovídá pouze zevní anatomii jater a pro funkční rozdělení jater na základě distribuce krve se nejčastěji používá členění jater na osm segmentů podle Couinauda.¹⁷

Játro může protékat až 25 % krve z celkového srdečního výdeje. Jejich dvojité krevní zásobení se dělí mezi portální žílu, která tvoří 70–75 % jaterního zásobení a přivádí neokysličenou krev obsahující živiny, xenobiotika a případně mikroorganismy z gastrointestinálního traktu a mezi jaterní tepnu, která tvoří zbylých 25–30 % a představuje zdroj kyslíku pro jaterní tkáň.^{18,19} Větve jaterní tepny a portální žíly unášejí krev k hepatocytům, které látky obsažené v krvi vstřebávají. Metabolity hepatocytů jsou sekretovány zpět do krve a prostřednictvím centrálních žil jsou odváděny do jaterních žil, které následně ústí do dolní duté žíly.¹⁵

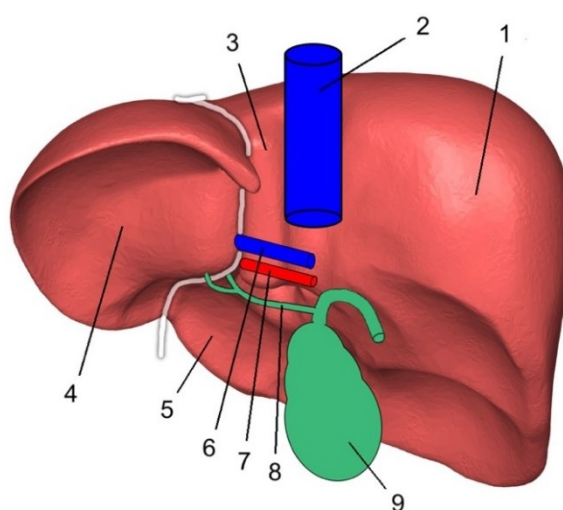
1.1.2 Mikroanatomie jater

Jaterní tkáň můžeme z morfologického hlediska charakterizovat pomocí jaterních lalůčků, které jsou popisovány jako šestihranné struktury. V jejich středu se nachází

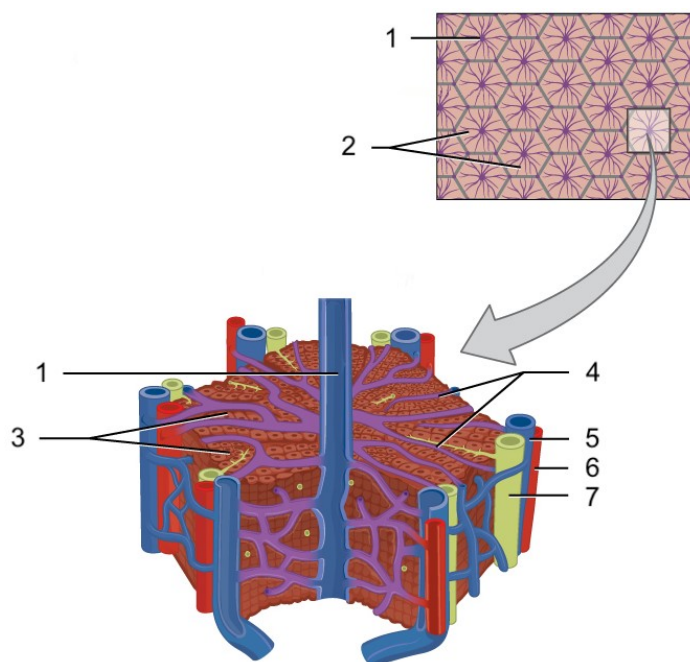
centrální žíla, od které se paprsčitě rozbíhají, většinou v jedné nebo ve dvou vrstvách, hepatocyty uspořádané do trámců.^{19,20} Stěny sousedících hepatocytů vytváří kapilární síť intralobulárních žlučovodů, které odvádějí hepatocyty produkovanou žluč. Intralobulární žlučovody ústí v portobiliárním prostoru, v místě styku tří sousedících jaterních lalůčků, do interlobulárního žlučovodu. Ten společně s interlobulární tepnou a interlobulární žílou (větve jaterní tepny a portální žíly) tvoří portální triádu.¹⁴ Mezi jednotlivými trámcí hepatocytů jaterního lalůčku probíhají sinusoidy, krevní kapiláry, do kterých je přiváděna krev z interlobulární tepny a interlobulární žíly, a které se následně sbíhají v centrální žíle (obr. 1.3, str. 14; obr. 1.4, str. 16).¹⁹



Obr. 1.1 Brániční plocha jater. 1 – levý lalok, 2 – dolní dutá žíla, 3 – pravý lalok, 4 – žlučník, 5 – *ligamentum falciforme*. Převzato a upraveno.²¹



Obr. 1.2 Viscerální plocha jater. 1 – pravý lalok, 2 – dolní dutá žíla, 3 – ocasatý lalok, 4 – levý lalok, 5 – čtyřhranný lalok, 6 – portální žíla, 7 – jaterní tepna, 8 – společný jaterní vývod, 9 – žlučník. Převzato a upraveno.²²



Obr. 1.3 Jaterní lalůček. 1 – centrální žíla, 2 – jaterní lalůčky, 3 – hepatocyty, 4 – sinusoidy, 5 – interlobulární žíla, 6 – interlobulární tepna, 7 – interlobulární žlučovod. Převzato a upraveno.²³

Kromě jaterního lalůčku může k popisu morfologie jater posloužit i portální lalůček, který je znázorňován jako pomyslný trojúhelník s centrálními žílymi ve vrcholech a portální triádou ve středu. Žluč produkovaná všemi hepatocyty daného portálního lalůčku je odváděna do jednoho interlobulárního žlučovodu.^{17,19}

V neposlední řadě může morfologickou jednotku jater představovat jaterní acinus. Jedná se o pomyslný útvar, jehož kratší osu utvářejí větve portální triády probíhající mezi sousedícími jaterními lalůčky a delší osu spojnice dvou centrálních. Z funkčního hlediska odpovídá jaterní acinus morfologii jater nejpřesněji, protože zohledňuje rozdílné krevní zásobení hepatocytů.^{17,19}

Hepatocyty jsou mnohostěnné buňky s průměrem 20–30 μm , které tvoří zhruba 60 % z celkového počtu jaterních buněk a přibližně 80 % z celkového objemu jaterní tkáně. Jedná se o jaterní funkční buňky a jejich poškození vede k akutnímu či chronickému onemocnění jater. Přibližně čtvrtina dospělých hepatocytů je dvoujaderná a na rozdíl od ostatních buněk obsahují obrovské množství organel, které se mění v závislosti na poloze hepatocytu v jaterním acinu. Hepatocyty obsahují vysoké množství inkluzí včetně granulí glykogenu. Glykogen se v hepatocytech může vyskytovat i ve formě glykosomů, struktur, jejichž součástí jsou kromě glykogenu i enzymy potřebné pro jeho syntézu. Glykosomy jsou často asociované s membránou hladkého

endoplazmatického retikula, kde dochází k regulaci koncentrace glukosy v krvi.^{24–26} Dále v hepatocytech nalezneme peroxisomy, které se podílí na β -oxidaci mastných kyselin a detoxikaci reaktivních forem kyslíku a lysozomy, které řídí degradační procesy proteinů.^{25,27} Kromě hepatocytů jsou v jaterní tkáni zastoupeny i další typy buněk.

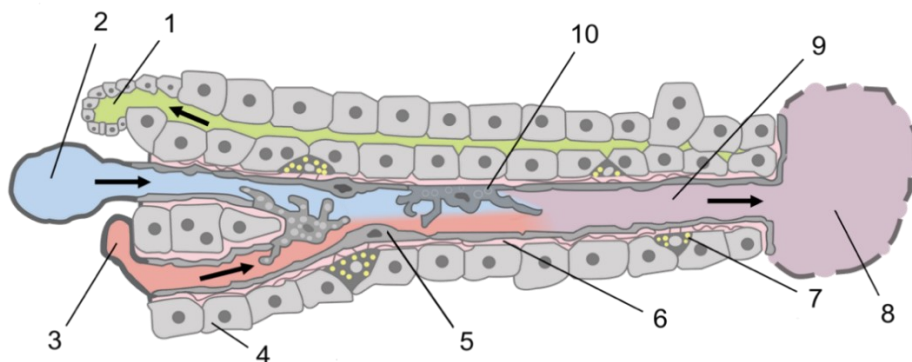
Endotelové buňky jsou ploché protáhlé buňky²⁴ tvořící asi 20 % všech jaterních buněk²⁸, které lemují stěny sinusoid a rozdělují tak lumen sinusoid od Disseho prostoru, extracelulárního prostoru mezi stěnami sinusoid a hepatocyty (obr. 1.4, str. 16). Obsahují charakteristické póry, fenestrace, které zajišťují možnost výměny látek mezi krví a Disseho prostorem a jejichž průměr se může měnit v reakci na endogenní a exogenní látky.^{29–31} Vykazují vysokou schopnost endocytózy zprostředkované receptory a jsou tak schopné z krevního oběhu vychytávat glykoproteiny, lipoproteiny a řadu dalších makromolekul.²⁴

Kupfferovy buňky jsou jaterní makrofágy nacházející se v lumen sinusoid, tvoří asi 10 % všech jaterních buněk a 80–90 % makrofágů v lidském těle.^{17,32} Kromě toho, že fagocytují mikroorganismy, poškozené buňky a cirkulující nádorové buňky, jsou v aktivovaném stavu schopné produkovat signální molekuly, které zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci. Hrají například důležitou roli v likvidaci endotoxinů z portální krve bez vyvolání lokální zánětlivé odpovědi. Toho je pravděpodobně docíleno autoregulačním mechanismem, který zajišťuje rovnovážné vylučování prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů.^{25,33}

Itoovy buňky (hvězdčovitě, stelární) se nachází v Disseho prostoru, tvoří 5–8 % všech jaterních buněk³⁴ a skladuje se v nich 40–70 % zásob vitaminu A v lidském těle.³⁵ Chronické poškození jater vede k produkci cytokinů Kupfferovými buňkami, které Itoovy buňky aktivují, iniciují jejich transdiferenciaci do myofibroblastů a stimulují proliferaci. Takto aktivované buňky vykazují zvýšenou produkci extracelulárních složek jako jsou kolageny, glykoproteiny a proteoglykany, jejichž nadměrný výskyt vede k jaterní fibróze.^{25,36,37}

Pit buňky ze skupiny NK buněk (z angl. *natural killer*, vrozený zabiják) se nacházejí v lumen sinusoid a představují méně než 1 % z celkového počtu jaterních buněk.²⁸ Vykazují především vysokou cytotoxickou aktivitu a jsou tak schopné likvidovat nádorové buňky a buňky nakažené viry.³⁸

Cholangiocyty lemují žlučové cesty a tvoří 3–5 % všech jaterních buněk.³⁹ Sekrecí a absorpcí se výrazně podílí na úpravě složení protékající žluči.⁴⁰



Obr. 1.4 Přibližná struktura jaterního lalůčku. 1 – interlobulární žlučovod, 2 – interlobulární žíla, 3 – interlobulární tepna, 4 – hepatocyt, 5 – endotelová buňka, 6 – Disseho prostor, 7 – Itoova buňka, 8 – centrální žíla, 9 – sinusoida, 10 – Kupfferova buňka, šipky znázorňují směr přitékající portální a tepenné krve a odtékající žluči. Převzato a upraveno.⁴¹

1.1.3 Funkce jater

Játra se podílejí na celé řadě funkcí jako je metabolismus sacharidů, lipidů a aminokyselin. Důležitou roli hrají při udržení koncentrace glukosy v krvi ve fyziologickém rozmezí. Zvýšené hodnoty glykemie vedou k syntéze glykogenu a navýšení aktivity glykolýzy a lipogeneze, naopak snížené hodnoty koncentrace glukosy v krvi stimuluje glykogenolýzu a glukoneogenezi. Kromě syntézy a degradace mastných kyselin játra zodpovídají i za produkci a vylučování krevní lipidů a regulaci jejich hladiny v krevním oběhu.¹⁷ Játra vykazují schopnost syntetizovat všechny neesenciální aminokyseliny, detoxikovat amoniak a probíhají v nich procesy jako deaminace a transaminace.⁴² V játrech jsou skladovány vitaminy A, D, E, K a B12⁴³ a dochází zde k syntéze plazmatických proteinů jako je albumin, fibrinogen a protrombin a proteinů akutní fáze. V membráně hladkého endoplazmatického retikula hepatocytů se nachází systém cytochromů P450, který hraje klíčovou roli v metabolismu xenobiotik.¹⁷

Tvorbu a sekreci žluči řadíme mezi další významné funkce jater. Žluč je tmavě zelená⁴⁴ tekutina složená převážně z vody, žlučových kyselin, bilirubinu, cholesterolu a dalších lipidů, která zprostředkovává vylučování látek a zároveň významně usnadňuje trávení a vstřebávání tuků z tenkého střeva.^{17,45}

1.1.4 Biochemická vyšetření jater

Biochemické testy jsou využívány ke stanovení vážnosti poškození jater, k určení prognózy, ke sledování klinického průběhu onemocnění i jako screening pacientů

s rizikem rozvoje jaterních nemocí. Onemocnění jater je často rozpoznáváno na základě zvýšené aktivity dále zmiňovaných jaterních enzymů v krevním séru. Stanovení aktivity těchto enzymů není využíváno k přímému měření funkce jater, jejich zvýšená aktivita pouze vypovídá o narušení integrity buněčné membrány hepatocytů. Portální krev může nicméně obsahovat řadu toxinů, xenobiotik a jejich metabolitů, které mohou ovlivnit výslednou sérovou aktivitu jaterních enzymů.⁴⁶

Zvýšená sérová aktivita aspartátaminotransferasy (AST) a alaninaminotransferasy (ALT) slouží jako marker hepatocytárního poškození. AST a ALT katalyzují přenos aminoskupiny z aspartátu nebo alaninu na 2-oxoglutarát a jsou klíčové při glukoneogenezi a tvorbě močoviny. Oproti ALT, která je přítomná nejvíce v játrech, je aktivita AST vysoká také v ledvinách, srdci, mozku a příčně pruhované svalovině. Zvýšená aktivita AST tudíž není považována za zcela specifickou pro jaterní onemocnění, jedná se však o poměrně významný kardiomarker. Nárůst aktivity aminotransferas je spojený s nekrózou hepatocytů v důsledku akutního poškození jater, v případě chronického onemocnění není nárůst tolik výrazný.^{17,46}

Alkalická fosfatasa (ALP) je membránový enzym ze skupiny hydrolas přítomný ve vyšších koncentracích v játrech, kostech a střevech. Nárůst jeho koncentrace v séru je především spojený s cholestatickými onemocněními, kdy je ALP vlivem detergentních vlastností žlučových kyselin uvolňována z membrány. Obstrukce žlučových cest vede ke stimulaci syntézy ALP *de novo* a vlivem zvýšeného tlaku dochází k narušení mezibuněčných spojů mezi hepatocyty a úniku ALP do krevního oběhu. Vysoká hladina ALP je mimo jiné tumorovým markerem a je spojená s nejrůznějšími nemocemi kostí.^{17,46}

Gama-glutamyltransferasa (GGT) je membránový enzym, který katalyzuje přenos gama-glutamyllových zbytků z peptidů jako glutathion na jiné aminokyseliny či peptidy. Nachází se především ve tkáních s vysokou sekreční a absorpční funkcí, jako jsou játra, ledviny a pankreas a stejně jako ALP představuje marker onemocnění žlučových cest. Vyšší hodnoty koncentrace GGT v séru lze také pozorovat v případě infarktu myokardu, diabetu či chronického užívání alkoholu.^{17,46}

Bilirubin je degradační produkt hemoglobinu a v játrech podléhá konjugaci s kyselinou glukuronovou. V důsledku obstrukce žlučových cest nebo poškození hepatocytů dochází k vylučování konjugovaného bilirubinu do systémové cirkulace, naopak zvýšená hladina nekonjugovaného bilirubinu v séru může být projev hemolýzy nebo např. Gilbertova syndromu. Dále lze stanovením koncentrace plazmatických

proteinů v krvi měřit syntetickou činnost jater. Albumin je nejvíce zastoupený plazmatický protein a jeho snížená hladina je kromě jaterní cirhózy spojována také s poškozením ledvin a gastrointestinálního traktu. Biologický poločas albuminu je přibližně 20 dnů a nejedná se tedy o stanovení vhodné pro akutní poškození jater.¹⁷

1.2 *Biotransformace xenobiotik*

Xenobiotika jsou cizorodé, pro organismus nevlastní látky. Může se jednat o látky přírodního původu, nebo přímé či nepřímé produkty lidské činnosti jako jsou léčiva a polutanty životního prostředí. Po vstupu do buněk podléhají tyto látky biotransformaci, která má za cíl snížení jejich toxicity a usnadnění eliminace z těla.

Po vstupu do organismu a absorpci se xenobiotikum dostává do krevního řečiště, kterým je distribuováno k cílovým buňkám. Míra distribuce závisí především na průtoku krve a míře difúze z kapilár do buněk příslušné tkáně, která může souviset s vlastnostmi xenobiotika nebo membrány cílové buňky.^{47,48} Membránový transport do cytosolu probíhá prostřednictvím pasivní difúze, která je typická pro nízkomolekulární hydrofobní xenobiotika, pomocí usnadněné difúze a aktivního transportu, kterými jsou přenášena především hydrofilní xenobiotika a nebo mechanismem endocytózy.

Vlastní biotransformace je obecně chápána jako proces detoxikace daného xenobiotika, ovšem existují i případy aktivační reakce, kdy je xenobiotikum procesem biotransformace přeměněno na reaktivní meziprodukt, který vykazuje vyšší toxicitu než parentální látka. Aktivační reakce tak má velký význam ve farmacii, kdy mohou být léčiva účelově modifikována a k aktivaci daných proléčiv s požadovanými vlastnostmi může dojít až v cílových buňkách. Biotransformaci zpravidla dělíme na dvě fáze, přičemž v I. fázi se substrát zpravidla derivatizuje a ve II. fázi dochází k jeho konjugaci s endogenními látkami. Látky, které již polární skupiny obsahují, mohou však rovnou podstupovat II. fázi biotransformace.

1.2.1 *I. fáze biotransformace*

I. fáze biotransformace xenobiotik spočívá ve vnášení nebo odhalování polárních reaktivních skupin, které následně ve II. fázi slouží ke konjugacním reakcím. Výsledná zvýšená polarita snižuje prostupnost molekuly xenobiotika buněčnou membránou

a míru tubulární resorpce, čímž napomáhá jeho eliminaci.⁴⁹ Mezi reakce I. fáze biotransformace řadíme oxidační, hydrolytické a redukční reakce. Nejvýznamnějšími enzymy katalyzujícími oxidační reakce jsou monooxygenasy, které můžeme dělit na dvě skupiny – monooxygenasy systému cytochromu P450 (CYP) a flavinové monooxygenasy (FMO).⁵⁰ Obecný mechanismus CYP využívá NADPH jako zdroj elektronů a molekulární kyslík jako kosubstrát, přičemž jeden atom kyslíku je včleněn do molekuly substrátu a druhý je redukován na vodu. Elektrony jsou cytochromu P450 postupně dodávány nejčastěji pomocí NADPH:CYP reduktasy nebo NADH:cytochrom b₅ reduktasy.⁵¹

Oxidační reakce katalyzované CYP zahrnují hydroxylaci, epoxidaci, oxidaci nebo dealkylaci heteroatomu, deaminaci a dehydrogenaci.⁵² Hlavní role FMO spočívá převážně v oxidaci heteroatomů a tvorbě *N*- a *S*-oxidů.⁴⁷ Oxidační reakce jsou dále katalyzovány např. alkoholdehydrogenasou, aldehyddehydrogenasou, mono- a diaminoxidasou nebo xantinoxidasou. Hydrolytické reakce slouží k odkrytí polárních skupin štěpením esterových a amidových vazeb a probíhají pod katalytickým účinkem esteras, peptidas a fosfatas (např. cholinesterasa, chymotrypsin, ALP). Mezi redukční reakce patří zejména redukce azo- a nitrosloučenin, aldehydů, ketonů, *N*- a *S*-oxidů, disulfidů a chinonů.⁵²

1.2.2 II. fáze biotransformace

Konjugační reakce II. fáze biotransformace zahrnují glukuronidaci, sulfataci a konjugaci s glutathionem, methylaci, acetylaci a konjugaci s aminokyselinami. Glukuronát je při glukuronidačním procesu přenášen ve formě UDP-glukuronátu, který je syntetizován z glukosa-1-fosfátu a reakce je katalyzována UDP-glukuronosyltransferasami (UGT). Sulfatační reakce vyžaduje 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS), který vzniká sulfurylací a následnou fosforylací ATP. Mezi substráty obou reakcí patří alifatické a aromatické alkoholy, karboxylové kyseliny a aminy, přičemž fenoly a alifatické alkoholy jsou primárně substráty sulfotransferas.

Konjugace s glutathionem představuje hlavní detoxikační dráhu xenobiotik s elektrofilním atomem. Glutathion (GSH) je tripeptid složený z glycinu, cysteinu a glutamátu, přičemž glutamát je k cysteinu vázán jeho γ -karboxylovou skupinou postranního řetězce. Tvorbou vazby mezi GSH a glutathion-*S*-transferasou (GST), která

reakci katalyzuje, dochází ke stabilizaci deprotonované formy GSH, která ochotněji reaguje s elektrofilním atomem xenobiotika.⁵³

Methylace oproti ostatním konjugačním reakcím snižuje rozpustnost xenobiotika a maskuje funkční skupiny, které by potenciálně mohly reagovat s jinými konjugačními enzymy. Kofaktorem methylační reakce je *S*-adenosylmethionin a ke konjugaci dochází nukleofilním atakem methylu vázaného na sulfoniový kation. Methylaci podstupují fenoly, katecholy, alifatické a aromatické aminy, dusíkaté heterocyklické sloučeniny a sloučeniny obsahující sulfanylovou skupinu.⁵²

Acetylace je katalyzovaná *N*-acetyltransferasami, využívá acetylkoenzym A jako kofaktor a je typická pro aromatické aminy. Konjugace s aminokyselinami může probíhat u xenobiotik s karboxylovou skupinou, které po aktivaci koenzymem A vytváří amidovou vazbu s aminoskupinou glycinu, glutaminu nebo taurinu, nebo u xenobiotik s aromatickým hydroxylaminem, který reaguje s karboxylovou skupinou serinu a prolinu.⁵²

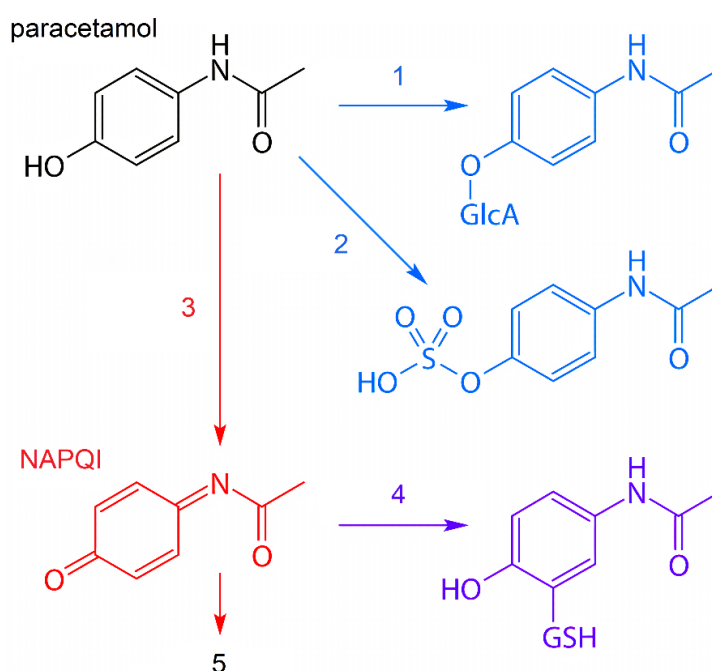
1.2.3 *Metabolismus paracetamolu*

Paracetamol (angl. *acetaminophen*, APAP) je široce využívaná léčivá látka s analgetickými a antipyretickými účinky.⁵⁴ V lidském těle může být APAP syntetizován *O*-dealkylací fenacetinu – analgetika a antipyretika, které bylo na přelomu 70. a 80. let staženo z prodeje z důvodu jeho nefrotoxických a karcinogenních účinků.⁵⁵ Maximální doporučená terapeutická dávka APAP je 4 g na den, přičemž jednorázová konzumace dávky větší než 7 g u dospělých a 150 mg/kg u dětí je považována za potenciálně hepatotoxickou a nefrotoxickou. Mediátorem toxicity je aktivní metabolit *N*-acetyl-*p*-benzochinon imin (NAPQI), který vzniká biotransformací APAP prostřednictvím CYP.⁵⁶

Paracetamol je velmi slabá organická kyselina omezeně rozpustná ve vodě i v tucích. Za fyziologického pH je APAP z většiny přítomný v neionizované formě a po vstupu do organismu je prostřednictvím pasivní difúze rychle absorbován z tenkého střeva do portálního oběhu.⁵⁴ Biologická dostupnost APAP při perorálním podání je téměř 90 % a maximální koncentrace v krvi je dosaženo do 90 minut po podání. Za doporučených dávek je plazmatický poločas APAP 1,5–2,5 hodiny, při předávkování může hodnota vzrůst nad 4 hodiny.⁵⁶

Biotransformace APAP (obr. 1.5, str. 21) probíhá převážně v játrech.⁵⁷ Po absorpci je 52–57 % APAP převedeno na glukuronid, 30–44 % na sulfát, 5–10 % je oxidováno

na reaktivní metabolit NAPQI a méně než 5 % je exkretováno v nezměněné formě.⁵⁸ Mezi nejvýznamnější enzymy zodpovídající za tvorbu NAPQI patří CYP2E1, CYP1A2 a CYP3A4 a jeho detoxikace spočívá v konjugaci se sulfanylovou skupinou GSH. Následně dochází k odštěpení glycinu a glutamátu, acetylaci aminoskupiny cysteinu za účelem snížení bazicity molekuly a výsledný konjugát je exkretován ve formě kyseliny merkapturové.^{56,57} Exkrece konjugovaného metabolitu probíhá 15–25× rychleji než v případě parentální molekuly APAP.⁵⁹



Obr. 1.5 Biotransformace paracetamolu. 1 – glukuronidace, 2 – sulfatace, 3 – oxidace, 4 – konjugace s glutathionem, 5 – tvorba proteinových aduktů. Převzato a upraveno.⁶⁰

Při toxických dávkách je asi 10 % APAP exkretováno v původním stavu a více než 15 % je metabolizováno na NAPQI. Po určité době dochází k vyčerpání zásob GSH a NAPQI vytváří proteinové adukty prostřednictvím vazby na sulfanylovou skupinu cysteinu. K vazbě dochází především u mitochondriálních proteinů a proteinů iontových kanálů, což vede k depleci ATP, narušení homeostáze iontů a tvorbě reaktivních forem kyslíku (z angl. *reactive oxygen species*, ROS).^{56,61,62} Mimo to NAPQI také reverzibilně oxiduje sulfanylové skupiny klíčových enzymů za tvorby disulfidických můstků.⁶³ Indukce mitochondriálního oxidativního stresu aktivuje fosforylační dráhu c-Jun N-terminální kinasy (JNK), která je translokována do mitochondrií a navozuje otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (z angl. *mitochondrial permeability transition pore*). Otevření MPTP umožňuje translokaci

faktoru indukujícího apoptózu (z angl. *apoptosis-inducing factor*, AIF) a endonukleasy G do jádra a fragmentaci DNA.^{64,65} V důsledku nekrózy hepatocytů dochází k uvolnění molekulárních vzorů asociovaných s poškozením (z angl. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) do extracelulárního prostoru⁶⁶, které např. prostřednictvím receptorů podobných genu Toll (z angl. *Toll-like receptor*, TLR) aktivují Kupfferovy buňky a ty v konečném důsledku indukují tvorbu prozánětlivých cytokinů.⁶⁷

N-acetylcystein působí jako antidotum proti předávkování APAP tím, že zabraňuje nadměrné tvorbě ROS a představuje zdroj cysteinu pro buňku. Cystein je prekurzorem GSH a PAPS, které následně slouží jako koenzymy konjugčních reakcí.⁶⁸

1.3 Hepatoprotektivní mechanismy

Sirtuin 1 a AMPK se podílí na tlumení oxidativního stresu, regulaci rozsahu imunitní odpovědi, stimulaci mitochondriální biogeneze a inhibici apoptózy^{3,5,10,69–73} a představují tak potenciální strategii pro léčbu DILI.

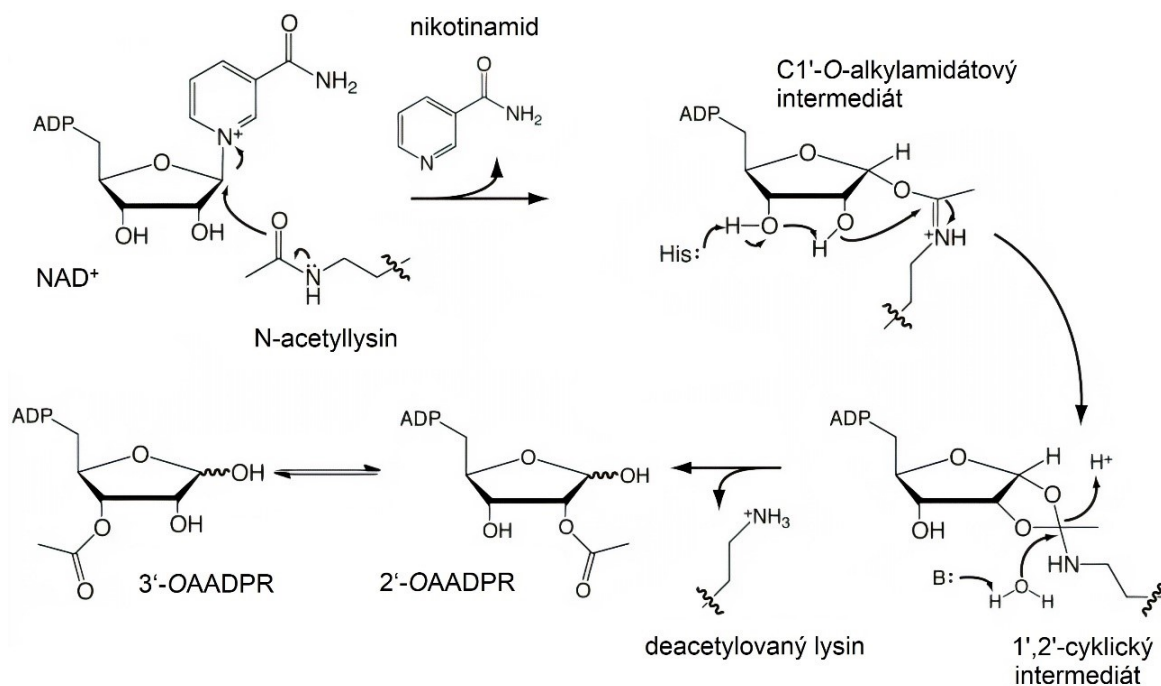
1.3.1 NAD^+ -dependentní deacetylasy sirtuin-1

Sirtuin 1 je enzym náležící do rodiny sirtuinů, se kterou sdílí vlastnosti jako regulace energetického metabolismu, stresové odpovědi a regenerace tkáně. U savců se nachází celkem sedm isoform SIRT1–7.¹ Sirtuin 1 je převážně přítomný v buněčném jádře a jeho funkce spočívá v deacetylaci histonů a více než 50 dalších nehistonových proteinů, která stimuluje cytoprotektivní mechanismy.⁷⁴ Extrémní stresové situace a s ní související vysoká exprese SIRT1 může na druhou stranu vést k poškození buněk^{1,75,76} a podporovat rozvoj metastáz.⁷⁷

Sirtuin 1 katalyzuje deacetylaci N-acetyllysinu s využitím NAD^+ jako koenzymu (obr. 1.6, str. 23). V prvním kroku reaguje acetyl s C1' nikotinamidribosy molekuly NAD^+ , dochází k uvolnění nikotinamidu a tvorbě *O*-alkylamidátového intermediátu. Dále reaguje 2'-OH skupina s *O*-alkylamidátem za tvorby 1',2'-cyklického intermediátu, jehož hydrolýzou v posledním kroku vzniká 2'-*O*-acetyl-ADP-ribosa (2'-OAADPR) a deacetylovaný lysin.⁷⁸

Lidský SIRT1 obsahuje tři hlavní strukturované oblasti: centrální katalytickou doménu, N-terminální doménu vázající STAC (z angl. *SIRT1-activating compound*;

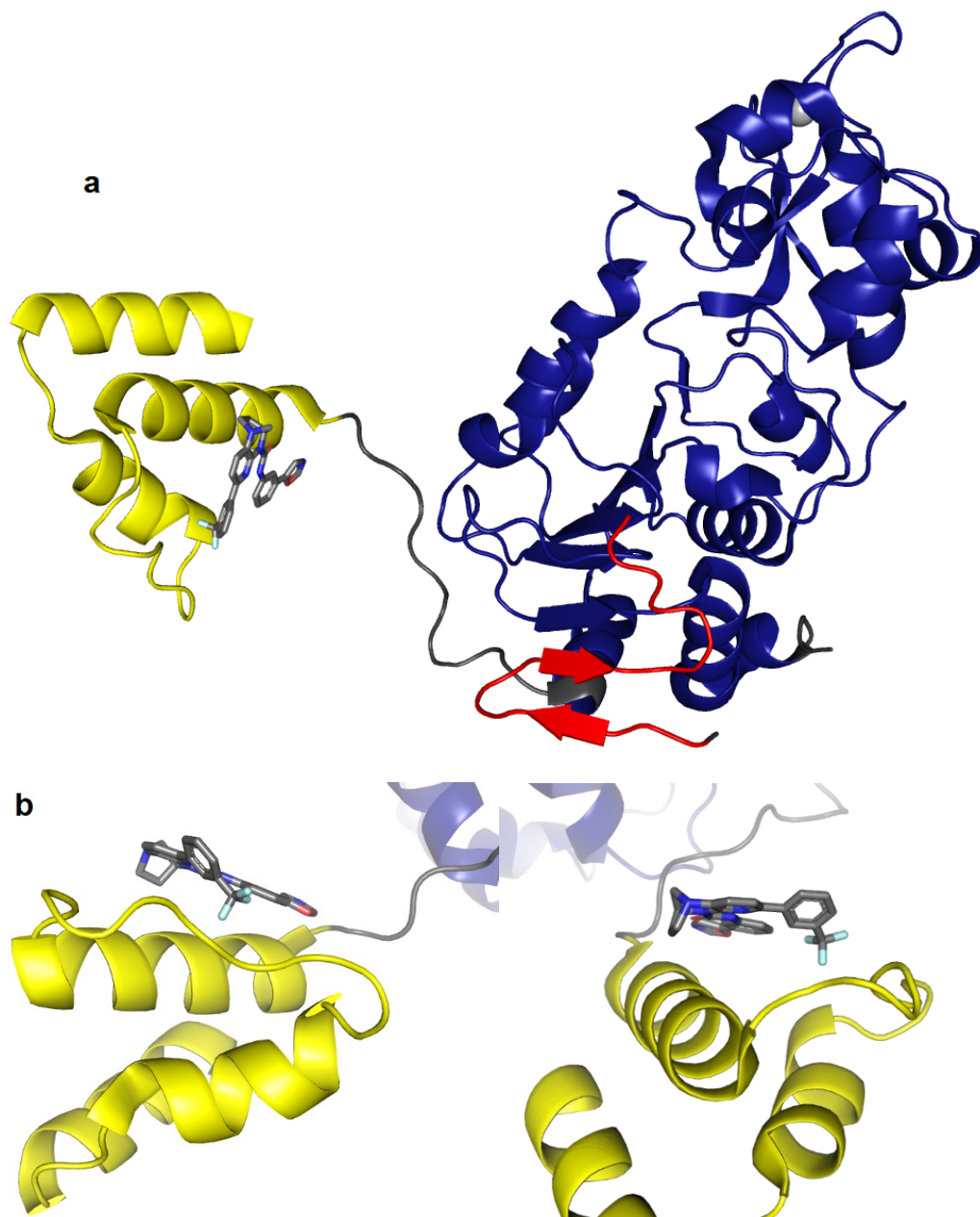
STAC-binding domain, SBD) a vzdálený C-terminální regulační segment (z angl. *C-terminal regulatory segment*, CTR) tvořený β -vlásečkou (obr. 1.7, str. 24; obr. 1.8a, str. 24).⁷⁹ Katalytická doména zahrnuje oblast vázající zinečnatý ion ve formě zinkového prstu a Rossmannovo uspořádání (z angl. *Rossmann fold*), strukturní motiv charakteristický pro enzymy vázající nukleotidové koenzymy složené z pravidelně se střídajících β -řetězců a α -helixů, které utvářejí sendvičové uspořádání α - β - α .⁸⁰ Motiv zinkového prstu je důležitý pro integritu SIRT1 a nepřímo se podílí na jeho katalytické funkci, na druhou stranu exogenní zinečnatý ion představuje nekompetitivní inhibitor SIRT1.⁸¹ Mezi β -řetězcem CTR a β -skládaným listem katalytické domény dochází k β -rozšíření (z angl. *β -augmentation*),⁷⁹ nespecifické interakci mezi β -řetězcí dvou proteinů nebo domén, při které dochází k rozšíření původní β -struktury.⁸² Proces β -rozšíření stabilizuje katalytickou doménu SIRT1 a zvyšuje hodnoty K_m jak pro acetylovaný substrát, tak pro NAD^+ . N-terminální SBD obsahuje tři α -helixy: druhý a třetí α -helix ve směru od N-konce tvoří strukturní motiv helix-otočka-helix (H2-T-H3), na který se váží STACs (obr. 1.8b, str. 24). Interakci STACs s motivem H2-T-H3 zprostředkovávají hydrofobní postranní řetězce aminokyselin L206, T209 (methylová skupina threoninu), P211, P212, L215, T219 (methylová skupina threoninu), I223, I227 a jedna hydrofilní interakce N226.⁷⁹



Obr. 1.6 Mechanismus deacetylační reakce katalyzovaná SIRT1. Převzato a upraveno.⁸³



Obr. 1.7 Schématická organizace primární struktury lidského SIRT1. Červeně SBD, zeleně katalytická doména, oranžově CTR. SBD, doména vázající STAC; STAC, sloučenina aktivující SIRT1; CTR, C-terminální regulační segment. Převzato a upraveno.⁷⁹

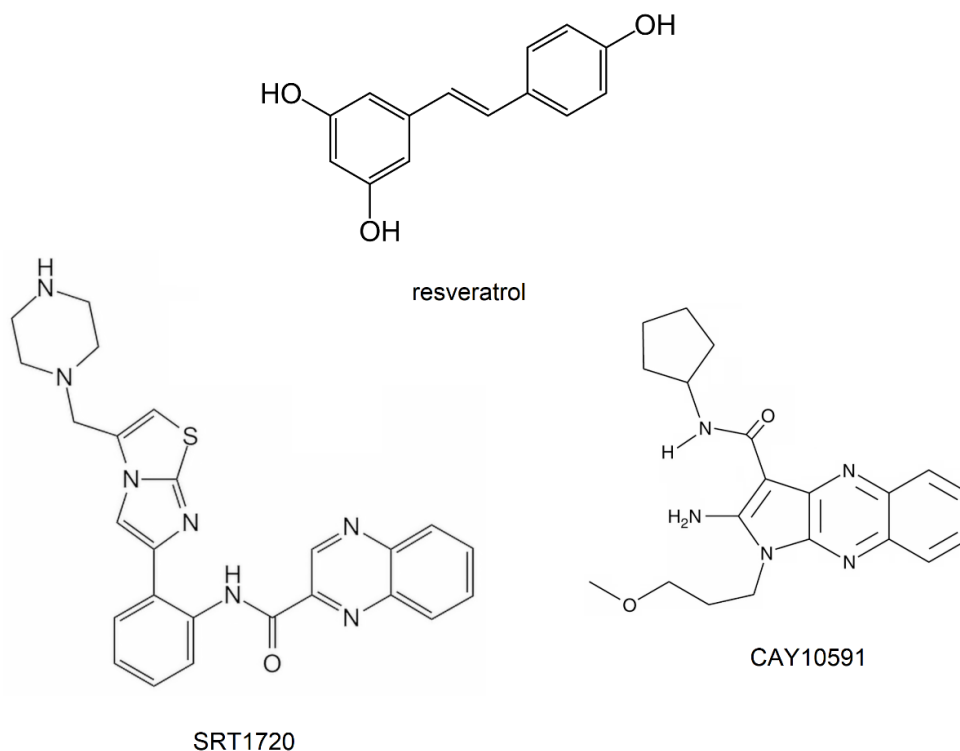


Obr. 1.8 Krystalová struktura SIRT1 v komplexu se STAC. **a**, Doménová organizace znázorněná stužkovým modelem: žlutě SBD, modře katalytická doména, červeně CTR. **b**, Přiblížení na interakci mezi STAC (tyčinkový model, šedě) a strukturním motivem H2-T-H3 (stužkový model, žlutě). STAC, sloučenina aktivující SIRT1; SBD, doména vázající STAC; CTR, C-terminální regulační segment. Vizualizace softwarem PyMol (PDB kód 4ZZH).

Sirtuin 1 indukuje expresi antioxidantních enzymů deacetylací transkripčních faktorů FOXO1, FOXO3a a FOXO4 (z angl. *Forkhead box protein O*)⁸⁴ a transkripčního koaktivátoru PGC-1 α (z angl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*).⁸⁵ Transkripční faktory FOXO mohou dále aktivovat proteiny GADD45 (z angl. *growth arrest and DNA damage-inducible protein*) a přispívat ke genomické stabilitě a opravě DNA.^{86,87} Mezi další cytoprotektivní mechanismy stimulované SIRT1 patří signální dráha Keap1/Nrf2/ARE (z angl. *Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element*). Za fyziologických podmínek je Keap1 v komplexu s Nrf2, což má za důsledek ubikvitinaci a následnou degradaci Nrf2. Deacetylací Nrf2 prostřednictvím SIRT1 vede k disociaci komplexu a translokaci Nrf2 do jádra, kde vazbou na ARE transaktivuje expresi genů pro cytoprotektivní enzymy jako HO-1, NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (NQO1) a GSTA1.^{88,89} Mimo to SIRT1 snižuje rozsah imunitní odpovědi přímo deacetylací p65 podjednotky transkripčního faktoru NF- κ B (z angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) a nepřímo prostřednictvím antioxidantních signálních drah, které brání v translokaci NF- κ B indukované ROS do jádra.^{3,90} Sirtuin 1 také přímo inhibuje apoptotickou dráhu transkripčního faktoru p53.⁹¹

Sirtuin 1 může být aktivován dvěma způsoby, a to pomocí STACs nebo sloučenin, které modulují hladinu NAD⁺ v buňce.⁷⁴ První způsob aktivace zahrnuje STACs přírodního a syntetického původu. Mezi STACs přírodního původu řadíme fenolické sloučeniny. Jedná se o sloučeniny s antioxidantními účinky nacházející se v ovoci, zelenině, obilovinách, čaji a kávě a podle chemické struktury je dělíme na fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany.^{1,92} Resveratrol je stilben s hepatoprotektivními účinky,^{93–96} u kterého byla v porovnání s ostatními fenolickými sloučeninami pozorovaná nejvyšší míra aktivace SIRT1, avšak doposud není jednoznačné, zda resveratrol SIRT1 aktivuje přímo, nepřímo prostřednictvím AMPK, nebo jestli působí nezávisle na SIRT1. Syntetické STACs jsou zaprvé deriváty imidazothiazolového bicyklu, tedy sloučeniny strukturně odlišné od resveratrolu (obr. 1.9, str. 26). Patří mezi ně SRT1460, SRT1720, SRT2183 a SRT2104, které SIRT1 aktivují až s 1000 \times vyšší účinností než resveratrol. Mezi novější skupinu STACs patří sloučeniny s benzimidazolovým bicyklem a sloučeniny s přemostující molekulou močoviny (STAC-5, STAC-9 a STAC-10), které vykazují podobné vlastnosti jako předešlé STACs.^{74,97} Vysokokapacitním screeningem byla identifikována řada dalších STACs, patří mezi ně např. CAY10591

(obr. 1.9).⁹⁸ Obecně STACs působí mechanismem allosterické aktivace, kdy vazba STACs na SBD zvyšuje afinitu SIRT1 k substrátu.⁹⁹



Obr. 1.9 Chemická struktura resveratrolu, SRT1720 a CAY10591. Převzato a upraveno.^{100–102}

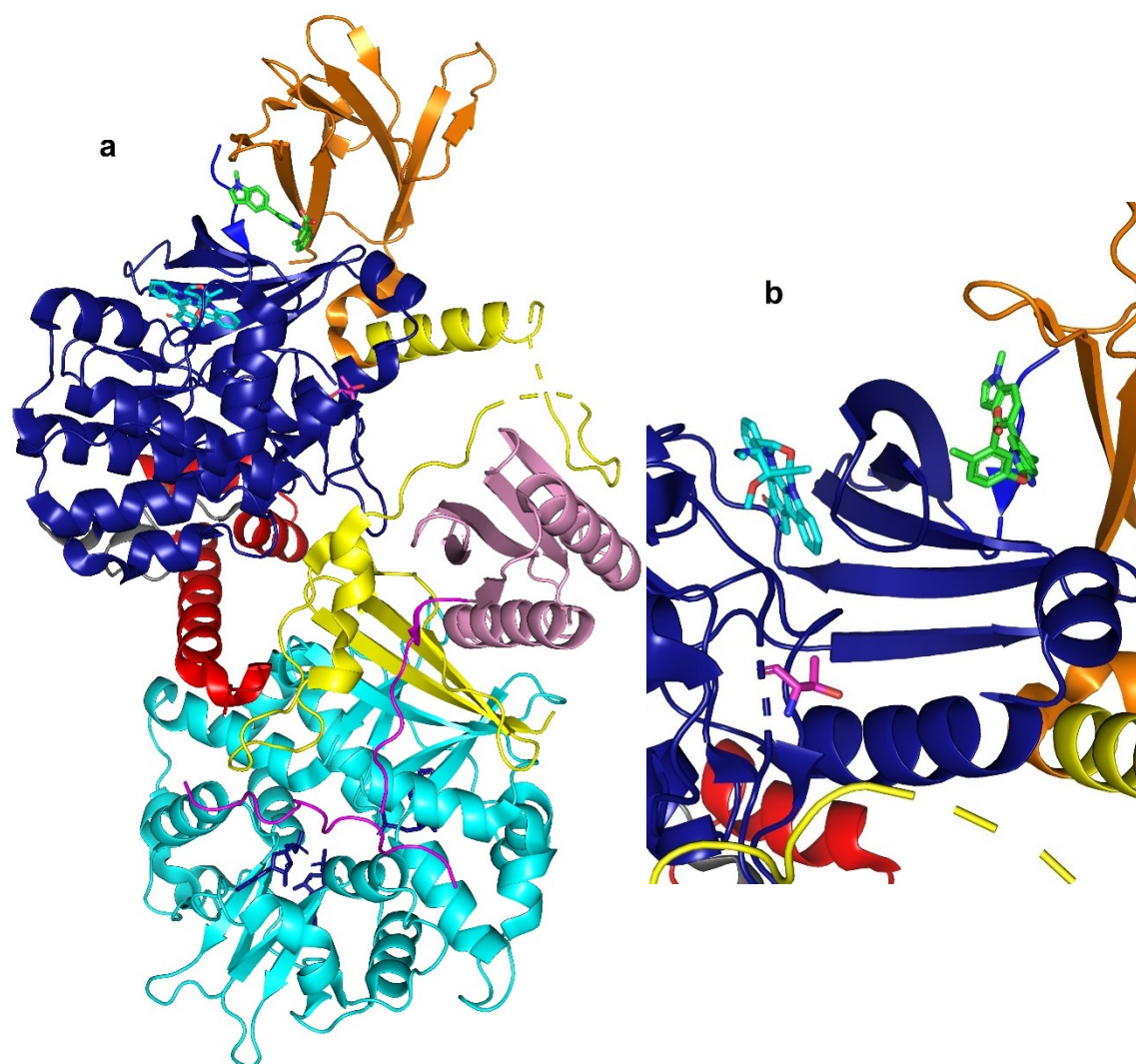
Druhý přístup je zaměřený na regulaci koncentrace NAD^+ , koenzymu nezbytného pro deacetylasovou aktivitu SIRT1. U savců je NAD^+ buď syntetizován z tryptofanu *de novo* nebo regenerací nikotinamidu, kyseliny nikotinové a nikotinamid ribosidu.¹⁰³ Hladina NAD^+ se zvyšuje přímým dodáním prekursorů NAD^+ nebo aktivací enzymů zapojených v syntéze a regeneraci NAD^+ jako nikotinamidmononukleotidadenylyltransferasa (NMNAT), nikotinamidfosforibosyltransferasa (NAMPT) a indolamin-2,3-dioxygenasa (IDO).¹⁰⁴ Fenolická sloučenina epigallokatechin-3-gallát (EGCG) přítomná v listech zeleného čaje je aktivátorem NMNAT.¹⁰⁵ Hladina NAD^+ může být naopak zvýšena inhibicí enzymů zodpovědných za degradaci NAD^+ .¹⁰⁴ Jeden z hlavních enzymů zodpovědných za hydrolytické štěpení NAD^+ je enzym CD38 a jeho zvýšená koncentrace ve tkáních je spojována s procesem stárnutí.¹⁰⁶ Flavonoidy jako quercetin či apigenin inhibují CD38 a zvyšují koncentraci NAD^+ v buňce.¹⁰⁷

Inhibitory SIRT1 byly studovány zejména v oblasti protinádorové léčby, zvýšená exprese SIRT1 totiž může inhibicí p53 a FOXO vést ke stimulaci proliferace nádorových

buněk. Jedná se o nikotinamid a jeho analogy, sloučeniny obsahující thioacyllysin, sloučeniny obsahující 2-naftol a deriváty indolu. Derivát indolu selisistat označovaný EX-527, 6-chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-karbazol-1-karboxamid, je momentálně v klinických studiích nejvyužívanějším specifickým inhibitorem SIRT1 s hodnotou IC_{50} v rozmezí 60–100 nM.¹⁰⁸ Tvorbou komplexu s vedlejším produktem deacetylační reakce 2'-*O*-acetyl-ADP-ribosou (obr. 1.6, str. 23) EX-527 brání v jeho uvolnění a blokuje tak vazebné místo pro NAD^+ .¹⁰⁹

1.3.2 *Proteinkinasa aktivovaná AMP*

Serin/threonin kinasa AMPK je heterotrimerický komplex složený z jedné katalytické α -podjednotky a dvou regulačních podjednotek β a γ (obr. 1.10a, str. 28). U savců existují dvě isoformy α - a β -podjednotky a tři isoformy γ -podjednotky. Součástí γ -podjednotky jsou čtyři strukturní motivy CBS1–4 (název podle cystathion- β -synthasy), které jsou zodpovědné za vazbu adeninových nukleotidů.¹¹⁰ Mezi nejvíce popsány mechanismus aktivace AMPK patří fosforylace T172 α -podjednotky prostřednictvím vazby AMP nebo ADP na CBS γ -podjednotky.¹¹¹ ATP přitom vazbu AMP a ADP kompetitivně inhibuje, což naznačuje, že AMPK mění svou fosforylační činnost v závislosti na koncentračních poměrech AMP/ATP a ADP/ATP.⁸ Katalytická α -podjednotka AMPK zahrnuje N-terminální kinasovou doménu (KD), na ni navazující autoinhibiční doménu (AID) a α -linker, který interaguje s γ -podjednotkou prostřednictvím strukturních motivů α -RIM (z angl. *regulatory subunit-interacting motif*). Vazba nukleotidů na CBS-3 indukuje tvorbu stabilních interakcí mezi γ -podjednotkou a strukturními motivy α -RIM1 a α -RIM2, které snižují flexibilitu α -linkeru, indukují pevnější asociaci α - a γ -podjednotky a znemožňují přístup fosfatasy k T172 α -podjednotky. Vazbou α -RIM na γ -podjednotku zároveň dochází k tvorbě vazby mezi AID a CBS-2, posunu AID směrem od KD, a tudíž k allosterické aktivaci AMPK.¹¹² Mechanismus takovéto aktivace schematicky znázorňuje obrázek 1.11 na straně 29. Fosforylace T172 α -podjednotky AMPK je regulována minimálně třemi kinasami a třemi fosfatasy, z nichž nejvýznamnější kinasu představuje LKB1 (z angl. *liver kinase B1*).⁸ Vedle toho zahrnuje β -podjednotka doménu CBM (z angl. *carbohydrate-binding module*) vázající glykogen. Rozhraní CBM a KD vytváří tzv. místo ADaM (z angl. *allosteric drug and metabolite*), do kterého se mohou určité látky vázat a allostericky tak aktivovat AMPK stabilizací interakce mezi KD a CBM (obr. 1.10b, str. 28).¹¹³

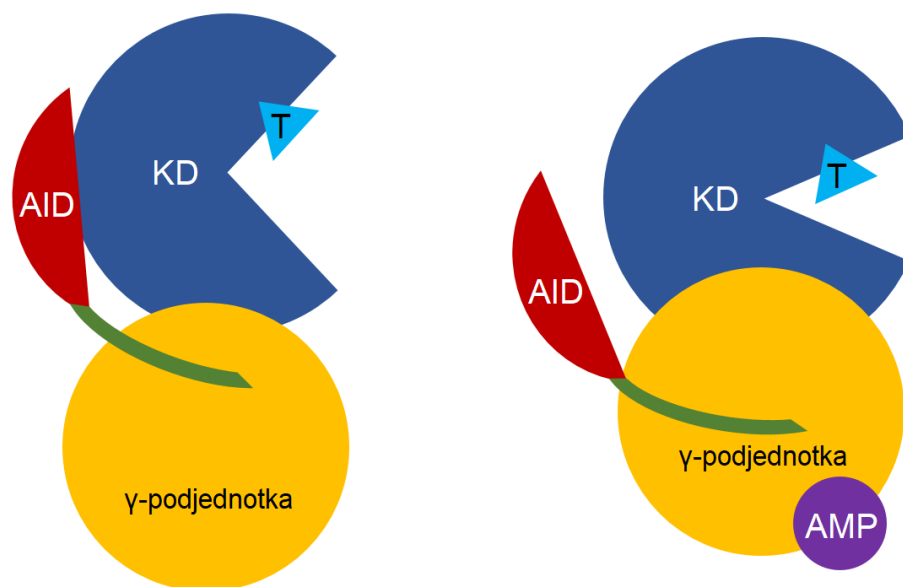


Obr. 1.10 Krystalová struktura heterotrimeru $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ AMPK v komplexu s aktivátorem a inhibítozem. **a**, Doménová organizace znázorněná stužkovým modelem: $\alpha 2$ -podjednotka modře (KD), červeně (AID), fialově (α -linker) a růžově, $\beta 1$ -podjednotka oranžově (CBM) a žlutě, $\gamma 1$ -podjednotka tyrkysově. **b**, Přiblížení na fosforylovaný T172 (tyčinkový model, fialově), vazbu inhibítora (tyčinkový model, tyrkysově) v aktivním místě a vazbu aktivátoru (tyčinkový model, zeleně) v místě ADaM. KD, N-terminální kinasová doména; AID, autoinhibiční doména; CBM, doména vázající sacharid; ADaM, allosterické místo na rozhraní CBM a KD vázající léčiva a jejich metabolity. Vizualizace softwarem PyMol (PDB kód 5ISO).

Proteinkinasa aktivovaná AMP reguluje metabolismus lipidů: inhibuje syntézu mastných kyselin, cholesterolu a triacylglycerolů *de novo* a stimuluje proces β -oxidace. K inhibici syntézy mastných kyselin dochází fosforylací acetyl-CoA-karboxylasy 1 (ACC1) nebo transkripčního faktoru SREBP-1c (z angl. *sterol regulatory element-binding protein 1c*), který za normálních okolností stimuluje expresi lipogenních enzymů včetně ACC1 a synthasy mastných kyselin.^{114,115} Dále AMPK blokuje syntézu triacylglycerolů a cholesterolu inhibicí glycerolfosfátacyltransferasy a HMG-CoA-

reduktasy^{116,117} a stimuluje katabolismus lipidů aktivací karnitinpalmitoyltransferasy I (CPT1) a inhibicí ACC2.¹¹⁴

Mimo to AMPK aktivuje 6-fosfofruktokinazu 2, která produkuje fruktosu-2,6-bisfosfát, allosterický aktivátor fosfofruktokinasy 1, a podílí se tak na stimulaci glykolýzy.¹¹⁸ Dále AMPK inhibuje syntézu glykogenu fosforylací glykogensynthasy a aktivuje štěpení glykogenu fosforylací glykogenfosforylasy.⁸ V játrech AMPK blokuje glukoneogenezi inhibicí transkripčních faktorů HNF4 (z angl. *hepatocyte nuclear factor 4*) a CRTC2 (z angl. *CREB-regulated transcription coactivator 2*), které stimulují expresi genů pro PEP-karboxykinasu a glukosa-6-fosfatasu.^{119,120} Vysoká hladina glukosy a snížení koncentračního poměru NAD^+/NADH vede k nepřímé inhibici SIRT1, který za normálních podmínek deacetylací aktivuje LKB1/AMPK.⁸



Obr. 1.11 Schéma mechanismu aktivace AMPK. Vazba AMP na CBS-3 γ -podjednotky indukuje interakci mezi γ -podjednotkou a α -linkerem (zeleně), která vede k pevnější asociaci α - a γ -podjednotky a brání fosfatasám v přístupu k T172 (T, světle modře). Zároveň dochází k vazbě mezi AID a CBS-2 γ -podjednotky, oddálení AID od KD a allosterické aktivaci AMPK. CBS, doména γ -podjednotky vázající AMP; KD, N-terminální kinasová doména α -podjednotky; AID, autoinhibiční doména α -podjednotky.

Kromě toho se AMPK podílí na autofágii, která hraje důležitou roli při udržování mitochondriální homeostáze. Transkripční faktor FOXO upreguluje expresi genů pro proteiny indukující autofágii a je aktivován fosforylací prostřednictvím AMPK.⁸ Zároveň AMPK reguluje mitochondriální biogenezi aktivací PGC-1 α ,¹²¹ a to buď jeho přímou fosforylací¹²² nebo nepřímo indukcí exprese NAMPT, zvýšením poměru NAD^+/NADH a následnou deacetylací PGC-1 α katalytickou činností SIRT1.¹²³

V neposlední řadě AMPK reguluje zánětlivou odpověď signalizační dráhou JNK/NF- κ B¹²⁴ a spolu se SIRT1 sdílí antioxidační signalizaci přes Nrf2.^{88,125} Všechny výše popsané mechanismy včetně metabolismu lipidů jsou navíc propojeny s hepatotoxicitou indukovanou paracetamolem.^{10,71,126–128}

Mezi nepřímé aktivátory AMPK řadíme biguanidy, thiazolidindiony a fenolické sloučeniny.¹²⁹ Pod biguanidy spadá široce využívané antidiabetikum metformin, který inhibuje komplex I dýchacího řetězce a zvyšuje poměr AMP/ATP.¹³⁰ Mechanismus účinku thiazolidindionů spočívá v aktivaci transkripčních faktorů PPAR (z angl. *peroxisome proliferator-activated receptor*).¹³¹ Fenolické sloučeniny jako resveratrol, quercetin a EGCG inhibují mitochondriální F-ATPasu a rovněž zvyšují poměr AMP/ATP.¹³² Jedním z přímých aktivátorů AMPK je AICAR, 5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid. Jedná se o adenosinový analog, který je po vstupu do buňky adenosinkinasou fosforylován na AICA-ribonukleotid¹³³, pod jehož působením dochází k allosterické aktivaci AMPK.¹³⁴ Dorsomorfin, 6-[4-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]fenyl]-3-(pyridin-4-yl)-pyrazolo-[1,5-a]pyrimidin (angl. *compound C*, CC), je široce využívaný kompetitivní inhibitor AMPK, který se váže do jejího aktivního místa.¹³⁵ Vzhledem ke zprávám o schopnosti CC inhibovat několik dalších kinas existují spekulace o jeho selektivitě,^{136–138} avšak i navzdory těmto kontroverzím, je jako inhibitor AMPK nadále využíván.

2 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo zkoumání potenciálních hepatoprotektivních účinků modulátorů SIRT1 a AMPK a jejich vzájemné propojenosti na experimentálních modelech hepatocytárního poškození. Pro dosažení tohoto cíle musely být splněny následující dílčí úkoly:

- izolace hepatocytů z potkaních jater a jejich následná kultivace,
- indukce hepatocytárního poškození a kultivace primárních kultur hepatocytů s modulatory SIRT1 a AMPK,
- určení míry poškození hepatocytů a stanovení aktivity SIRT1.

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

Abcam, UK

Rat ALT SimpleStep ELISA[®] Kit

B. Braun Medical s.r.o., ČR

aqua pro injectione

Bio-Rad, USA

DC Protein Assay

BioVendor, ČR

^LALT (GPT) kit, standard ^DBiocal

Sigma-Aldrich, USA

dimethylsulfoxid (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (fosfátový pufr, PBS), hovězí sérový albumin (BSA), chlorid sodný (0,9%), roztok insulínu z hovězího pankreatu (10 mg/ml v 25mM HEPES), kolagen z potkaních ocasů, Penicilin-Streptomycin (10 000 U penicilinu a 10 mg streptomycinu na mililitr 0,9% NaCl), Phosphatase Inhibitor Cocktail 3, Protease Inhibitor Cocktail, RIPA Lysis Buffer 10X, SIRT1 Assay Kit, Sirtuin Activity Assay Kit (Fluorometric), trypanová modř, William's E Medium

Thermo Fisher Scientific, USA

fetální hovězí sérum (FBS), L-glutamin (200 mM)

3.2 Použité přístroje a pomůcky

analytické váhy	Adventurer [™] Pro (<i>OHAUS Corporation, USA</i>)
automatické pipety	Research [®] (<i>Eppendorf, Německo</i>)
centrifugy	Sigma 2K15 Centrifuge (<i>B. Braun, Německo</i>)
čtečky mikrotitračních destiček	Helios Gamma (<i>Thermo Electron Corporation, USA</i>)

	Infinite [®] 200 PRO (<i>Tecan Trading AG, Švýcarsko</i>)
	Sunrise [™] (<i>Tecan Trading AG, Švýcarsko</i>)
	GENios [™] (<i>Tecan Trading AG, Švýcarsko</i>)
injekční stříkačky	Omnican [®] 100 (<i>B. Braun, Německo</i>)
inkubátory	SANYO CO ₂ Incubator (<i>Sanyo, Japonsko</i>)
	Mini-Incubator „Cultura“ (<i>Macherey-Nagel, Německo</i>)
	Economy Incubator Size 1 (<i>Gallenkamp, UK</i>)
laboratorní třepačky	3D Sunflower Mini-Shaker (<i>Biosan, Lotyšsko</i>)
	Bio Vortex V1 (<i>Biosan, Lotyšsko</i>)
laminární box	HeraSafe HS18 (<i>Heraeus, Německo</i>)
mikroskop	Laboval 3 (<i>Carl Zeiss Jena, Německo</i>)
	Leica DM IL LED (<i>Leica Microsystems, Německo</i>)
mikrotitrační destičky	Nunc [™] Multidishes (<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>)
stěrka pro tkáňové kultury	Cell Scraper (<i>BIOLOGIX Research Company, Čína</i>)
sušárna	Sanyo Sterilizer MOV-212S (<i>Sanyo, Japonsko</i>)

3.3 Použité metody

Hepatocyty byly izolovány dvoufázovou kolagenasovou perfuzní metodou.¹³⁹ K izolaci byli použiti potkaní samci kmene Wistar o hmotnosti 270 g v prvním experimentu a 400 g ve druhém experimentu (kapitola 3.3.1, str. 35). Suspenze hepatocytů byla 100× zředěná a odebraná kapka byla pozorovaná ve světelném mikroskopu (Laboval 3) při zvětšení 8×12. Buňky byly počítány v 5×16 čtvercích obou polovin Bürkerovy komůrky a jejich počet byl vyjádřen v milionech na mililitr. Pro stanovení životnosti byla na podložní sklíčko spolu s 10 µl naředěné suspenze nanášeno 10 µl trypanové modři a došlo tak k obarvení mrtvých buněk.¹⁴⁰ Živé a mrtvé buňky byly pozorovány ve světelném mikroskopu (Laboval 3) při zvětšení 8×25 a počítány v 10 náhodně vybra-

ných zorných polích. Výsledná životnost byla uvedena jako procentuální poměr počtu živých buněk ku celkovému počtu buněk.

3.3.1 Kultivace hepatocytů

Kultivace tkáňových kultur proběhla za použití sterilních 24jamkových (24-WP, 15 mm) a 6jamkových (6-WP, 35 mm) destiček a Petriho misek (PM, 100 mm) a veškeré úkony byly prováděny v laminárním boxu. Nejprve byl připraven roztok kolagenu rozpuštěním 10 mg kolagenu v 33,3 ml 20mM kyseliny octové, který byl nanesen na kultivační plotny (200 μ l na 24-WP, 1 ml na 6-WP, 3 ml na PM). Minimálně po 15 minutách byl roztok kolagenu odsát a na kultivačních plotny byl přidán fyziologický roztok pro neutralizaci pH (0,5 ml na 24-WP, 2 ml na 6-WP, 12 ml na PM). Fyziologický roztok byl odebrán až těsně před nanesením hepatocytů, aby nedošlo k vyschnutí kolagenu.

Suspenze hepatocytů byla na základě vypočítaného počtu buněk a vypočítané životnosti naředěna na přibližnou hustotu 666 667 hepatocytů na mililitr kompletního média s 5% fetálním hovězím sérem (FBS) (tabulka 3.1) a následně byla nanesena na kultivační plotny (0,3 ml na 24-WP, 1,5 ml na 6-WP, 12 ml na PM; cca 2×10^5 hepatocytů na jednu 24-WP, 1×10^6 na jednu 6-WP, 8×10^6 na jednu PM). Nanesené buňky byly kultivovány 3 hodiny v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Neuchycené hepatocyty byly po 3 hodinách odsáty, na kultivační plotny bylo přidáno kompletní médium s 5% FBS zahřáté na 37 °C (0,3 ml na 24-WP, 1,5 ml na 6-WP, 12 ml na PM) a hepatocyty byly kultivovány přes noc (asi 21 hodin) opět při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Další den bylo médium odsáto a k hepatocytům byly přidány pracovní roztoky (0,3 ml na 24-WP, 1,5 ml na 6-WP, 12 ml na PM).

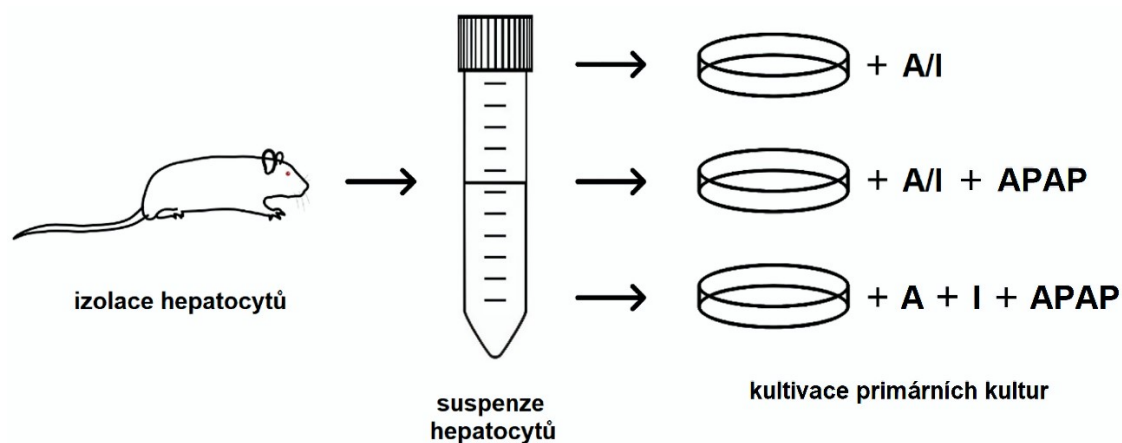
Tabulka 3.1

Příprava kompletního média s 5% FBS.

složka	V [ml]
William's E Medium	743,52
penicilin-streptomycin	8,00
glutamin	8,00
insulin	0,48
FBS	40,00
celkem	800,00

K modulaci aktivity SIRT1 a AMPK byly využity pracovní roztoky aktivátorů CAY10591 (CAY, 30 μ M), SRT1720 (SRT, 10 μ M) a AICAR (50 μ M) a inhibitorů EX-527 (EX, 10 μ M) a CC (10 μ M), všech v 0,5% DMSO. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky modulátorů rozpuštěním daných látek v DMSO a následně byly do kompletního média s 5% FBS přidány příslušné objemy zásobních roztoků, aby bylo dosaženo požadované koncentrace pracovních roztoků. Byly provedeny dva experimenty, přičemž v prvním experimentu bylo poškození indukováno roztokem paracetamolu o koncentraci 12,5 mM a ve druhém experimentu roztokem paracetamolu o koncentraci 10 mM. Kontrolní skupinu představovaly hepatocyty v čistém kompletním médiu s 5% FBS a 0,5% DMSO.

V prvním experimentu byly PM s pracovními roztoky kultivovány 4 hodiny, 6-WP se skupinami po třech jamkách a 24-WP se skupinami po čtyřech jamkách byly kultivovány 24 hodin. Ve druhém experimentu byly 4 hodiny navíc kultivovány také 24-WP, opět se vzorky na 6-WP v triplicátech a na 24-WP v tetraplikátech. Kultivace proběhla znovu v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Rozvržení experimentu je schematicky znázorněno na obrázku 3.1, skupiny pracovních roztoků, se kterými byly hepatocyty kultivovány v rámci obou experimentů, shrnuje tabulka 3.2 na straně 37.



Obr. 3.1 Schéma experimentu. Po izolaci hepatocytů z potkaních jater dvoufázovou kolagenasovou perfuzní metodou byly hepatocyty kultivovány s roztoky aktivátorů (A) a inhibitorů (I) SIRT1 a AMPK a s roztokem paracetamolu (APAP). Kultivace proběhla se samotnými roztoky A a I, s roztoky A nebo I v kombinaci s APAP a s kombinacemi A + I a APAP.

Tabulka 3.2

Rozvržení jednotlivých skupin pracovních roztoků pro první a druhý experiment.

číslo skupiny	první experiment	druhý experiment
1	kontrola	kontrola
2	CAY	SRT
3	EX	EX
4	AICAR	AICAR
5	CC	CC
6	APAP	APAP
7	APAP + CAY	APAP + SRT
8	APAP + EX	APAP + EX
9	APAP + AICAR	APAP + AICAR
10	APAP + CC	APAP + CC
11	APAP + CAY + EX	APAP + SRT + AICAR
12	APAP + AICAR + EX	APAP + EX + CC
13	APAP + CAY + CC	–
14	APAP + AICAR + CC	–

V prvním experimentu byl použit roztok paracetamolu (APAP) o koncentraci 12,5 mM, ve druhém experimentu byla koncentrace paracetamolu 10mM. Aktivita SIRT1 a AMPK byla modulována 30μM CAY, 10μM SRT, 50μM AICAR, 10μM EX a 10μM CC. Kontrolní skupina byla připravena kultivací hepatocytů s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO.

3.3.2 Zpracování hepatocytů

Hepatocyty v kultivačních plotnách a mikrozkuřavkách byly po celou dobu udržovány na ledu. V prvním experimentu bylo z 6-WP (24 h) do zkumavek odebráno médium, vždy ze tří jamek 6-WP s příslušnou skupinou do jedné zkumavky. Zkumavky s médii byly skladovány při 4 °C a byly později využity pro stanovení aktivity ALT (kapitola 3.3.4, str. 38). Médium z PM (4 h) bylo odsáto a hepatocyty byly promyty 12 ml studeného (4° C) PBS. K hepatocytům bylo následně přidáno 600 μl studeného (4° C) lyzačního RIPA pufru s inhibitory proteas a fosfatas (oba inhibitory 1 % V/V). Hepatocyty byly s RIPA pufrem inkubovány 10 minut při teplotě 4 °C a následně byly pomocí stěrky pro tkáňové kultury přeneseny do mikrozkuřavek, vždy z každé PM do jedné mikrozkuřavky. Hepatocyty byly homogenizovány opakovaným nasátím (10×) do injekční stříkačky (27 G) a homogenizát byl následně centrifugován (14 000× g, 10 minut, 4 °C). Supernatant byl odebrán do čistých vychlazených mikrozkuřavek, skladován při –80 °C a následně využit pro stanovení aktivity SIRT1 (kapitola 3.3.6, str. 40) a koncentrace proteinů (kapitola 3.3.7, str. 42).

Ve druhém experimentu médium odebráno z PM (4 h) a 6-WP (24 h), ze tří jamek 6-WP s příslušnou skupinou a z každé PM do jedné zkumavky. Zkumavky

s médií byly rovněž skladovány při 4 °C a byly později využity pro stanovení aktivity ALT (kapitola 3.3.4, str. 38) a stanovení koncentrace ALT (kapitola 3.3.5, str. 39). Hepatocyty byly promyty 2 ml (6-WP), resp. 12 ml (PM) studeného (4° C) PBS a pomocí stěrky byly rovnou přeneseny do mikrozkušavek (opět ze tří jamek 6-WP, resp. z jedné PM do jedné mikrozkušavky). Vzorky byly zmrazeny v kapalném dusíku, skladovány při –80 °C a následně využity pro stanovení aktivity SIRT1 (kapitola 3.3.6, str. 40) a stanovení koncentrace proteinů (kapitola 3.3.7, str. 42). Homogenizace hepatocytů proběhla až v rámci stanovení aktivity SIRT1.

Hepatocyty z 24-WP byly v případě obou experimentů využity ke stanovení jejich viability (kapitola 3.3.3, str. 38).

3.3.3 *Stanovení viability hepatocytů*

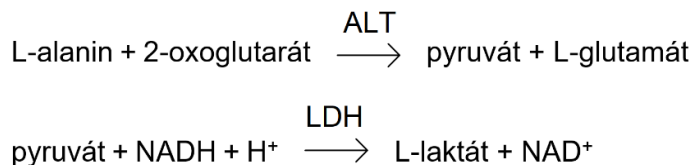
Kolorimetrický MTT test je založený na redukci žluté tetrazoliové soli na nerozpustný fialový formazan metabolicky aktivními buňkami prostřednictvím mitochondriálních NAD(P)H-dependentních oxidoreduktas.¹⁴¹

V prvním experimentu byla viabilita měřena u vzorků z 24-WP kultivovaných 24 hodin, ve druhém experimentu u vzorků z 24-WP inkubovaných 4 hodiny a 24 hodin (kapitola 3.3.1, str. 35). Nejprve byl připraven zásobní roztok MTT o koncentraci 5 mg/ml rozpuštěním práškového MTT v PBS a byl ponechán týden při teplotě 4 °C ve tmě. Pracovní roztok MTT byl připraven naředěním zásobního roztoku na koncentraci 1 mg/ml kompletním médiem bez FBS. Po odsátí média bylo do jamek 24-WP přidáno 300 µl pracovního roztoku MTT zahřátého na teplotu 37 °C a 24-WP byly inkubovány 3 hodiny v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Roztok byl následně odsát, do jamek bylo přidáno 500 µl DMSO a zakrytá destička byla ponechána při pokojové teplotě 10 minut na výkyvné třepačce. Vzorky z jednotlivých jamek na 24-WP byly po 100 µl v duplikátech přeneseny na 96jamkovou mikrotitrační destičku (96-WP) a byla měřena absorbance při 540 nm.

3.3.4 *Stanovení aktivity ALT*

Reakce katalyzovaná ALT spočívá v přenosu aminoskupiny z L-alaninu na 2-oxo-glutarát za vzniku pyruvátu a L-glutamátu. Pyruvát je následně za spotřeby NADH

laktátdehydrogenasou (LDH) redukován na L-laktát (obr. 3.2). Úbytek koncentrace NADH se projevuje poklesem absorpance při 340 nm a jemu přímo úměrnou aktivitu ALT tak lze spektrofotometricky stanovit.¹⁴²



Obr. 3.2 Spřažené reakce využívané při stanovení aktivity ALT. Dochází k přenosu aminoskupiny z L-alaninu na 2-oxoglutarát a redukcí vznikajícího pyruvátu za spotřeby NADH.

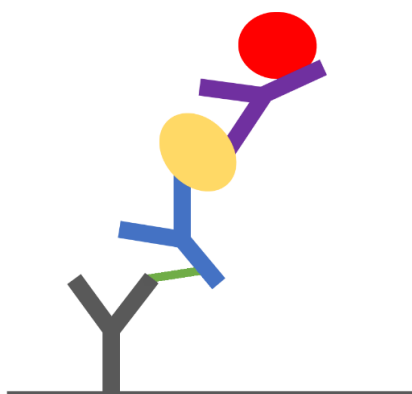
Měření bylo provedeno za použití komerčního kitu ^LALT (GPT) kit. V prvním experimentu byla aktivita ALT měřena u médií z 6-WP (24 h), ve druhém experimentu u médií z PM (4 h) a 6-WP (24 h) (kapitola 3.3.2, str. 37). Jednotlivé vzorky, standard a činidla (roztok R1 a R2) byly zahřáty na teplotu 37 °C, načež R1 (140 mM Tris pH 7,15; 700mM alanin; ≥ 38,3 μkat/l LDH) a R2 (85 mM 2-oxoglutarát; 1mM NADH) byly smíchány v poměru 4:1. Postupně bylo do kyvet nanášeno 1,0 ml směsi R1 a R2 a reakce byla zahájena přidáním 100 μl vzorku. Absorbance při 340 nm byla měřena proti prázdné kyvetě v časech 0, 1, 2 a 3 minuty.

3.3.5 Stanovení koncentrace ALT

Metoda ELISA (z angl. *enzyme-linked immuno sorbent assay*) je široce využívané imunochemické stanovení. Pro účely této práce byla využita modifikovaná sendvičová ELISA, při které se komplex záchytné protilátky, analytu a detekční protilátky váže na vrstvu imobilizované protilátky. K vazbě dochází prostřednictvím afinitní kotvy na záchytné protilátce a detekční protilátka je značená křenovou peroxidasou, která katalyzuje oxidaci tetramethylbenzidinu (TMB) na modrý imin. Přídavek kyseliny indukuje změnu barvy na žlutou a výsledná hodnota absorpance při 450 nm je přímo úměrná množství zachyceného analytu.¹⁴³ Vzniklý komplex analytu a protilátek je znázorněn na obrázku 3.3 na straně 40.

Měření bylo provedeno za použití komerčního kitu Rat ALT SimpleStep ELISA[®] Kit. Stanovení bylo provedeno pouze v rámci druhého experimentu a byly k němu využity média z 6-WP (24 h) (kapitola 3.3.2, str. 37). Jednotlivé vzorky, standard a činidla byly zahřáty na pokojovou teplotu (18–25 °C) a vzorky byly před nanášením

centrifugovány ($2000\times g$, 10 minut). Jednotlivé vzorky a roztoky standardů byly po 50 μl v duplikátech nanесeny na 96-WP a do všech jamek bylo následně přidáno 50 μl roztoku záchytné a detekční protilátky („Antibody Cocktail“). Koncentrace standardních roztoků byly 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500 a 1000 ng/ml. Zakrytá 96-WP byla inkubována 1 hodinu na výkyvné třepačce při pokojové teplotě, poté byl roztok odsát a jamky byly třikrát promyty 350 μl promývacího pufru („1X Wash Buffer PT“). Do všech jamek bylo přidáno 100 μl vyvíjejícího roztoku TMB („TMB Development Solution“) a 96-WP byla inkubována 10 minut ve tmě na třepačce. Po přidavku 100 μl terminačního roztoku („Stop Solution“) a minutové inkubaci na třepačce byla měřena absorbance při 450 nm s referenční vlnovou délkou 630 nm.



Obr. 3.3 Schéma uspořádání protilátek. Dochází k tvorbě komplexu záchytné protilátky (modře), analytu (žlutě) a detekční protilátky (fialově). Komplex se pomocí afinitní kotvy (zeleně) na záchytné protilátce váže na imobilizovanou protilátku (šedě). Detekční protilátka je značená křenovou peroxidasou (červeně).

3.3.6 Stanovení aktivity SIRT1

Jedná se o dvoustupňové fluorimetrické stanovení, které využívá peptid s fluoroforem a zhášející skupinou na opačných koncích jako substrát pro SIRT1. V prvním kroku dochází deacetylací lysinu ke zpřístupnění peptidu pro proteasu. Ve druhém kroku proteasa štěpí deacetylovaný peptid a uvolňuje fluorofor do roztoku. Měřená fluorescence je přímo úměrná deacetylační aktivitě SIRT1.

Měření bylo provedeno za použití komerčních kitů SIRT1 Assay Kit v prvním experimentu a Sirtuin Activity Assay Kit (Fluorometric) ve druhém experimentu. V prvním experimentu byla aktivita SIRT1 měřena u vzorků z PM (4 h), ve druhém

experimentu u vzorků z PM (4 h) a 6-WP (24 h) (kapitola 3.3.2, str. 37). Před nanesením byly vzorky vždy promíchány na laboratorní třepačce.

V prvním experimentu byl roztok standardu („Standard Solution“, roztok deacetylovaného substrátu) naředěn testovacím pufrém („Assay Buffer“) na koncentrace 0; 20; 40; 60 a 80 μM . Vzorky byly na 96-WP nanесeny po 5 μl , roztoky standardů byly nanášeny v duplikátech. Do všech jamek bez roztoků standardu bylo přidáno 5 μl roztoku NAD^+ a stejné jamky byly doplněny testovacím pufrém na celkový objem 40 μl . Pro slepý pokus bylo do jamky nanесeno 36 μl testovacího pufru a 4 μl lidského SIRT1 připraveného rekombinantní expresí v *E. coli*. (reakce bez NAD^+). Do všech jamek bez roztoku standardu bylo přidáno 10 μl roztoku substrátu („Substrate Solution“), zakrytá 96-WP byla promíchána na výkyvné třepačce a inkubována 30 minut při teplotě 37 °C. Do všech jamek (v případě jamek s roztoky standardů pouze do jedné jamky z každé dvojice, do druhé jamky bylo přidáno 5 μl testovacího pufru) bylo nanесeno 5 μl vyvíjejícího roztoku („Developing Solution“, roztok proteasy). Zakrytá 96-WP byla opět promíchána, inkubována 10 minut při teplotě 37 °C a následně byla změřena fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$; GENiosTM).

Ve druhém experimentu byly vzorky hepatocytů nejprve homogenizovány, po celou dobu homogenizace byly udržovány na ledu. Do mikrozku mávek se vzorky bylo přidáno 450 μl (6-WP), resp. 1 ml (PM) studeného homogenizačního pufru („Homogenization Buffer“, 150–300 μl na $1\text{--}5 \times 10^6$ buněk) s inhibitory proteas a fosfatas (oba inhibitory 1 % V/V). Hepatocyty byly homogenizovány opakovaným nasátím (10 \times) do injekční stříkačky (25 G), poté byly míchány na výkyvné třepačce 15 minut a homogenizát byl následně centrifugován (16 000 \times g, 20 minut, 4 °C). Supernatant byl přenesen do čistých vychlazených mikrozku mávek a udržován na ledu. Část vzorků byla odebrána, skladována při –80 °C a později použita pro stanovení koncentrace proteinů (kapitola 3.3.7, str. 42). Roztok standardu („AFC Standard“) byl v duplikátech naředěn testovacím pufrém s 2mM DTT („Sirtuin Assay Buffer with DTT“) na koncentrace 0; 2; 4; 6; 8 a 10 μM a 100 μl těchto roztoků bylo nanесeno na 96-WP s bílým dnem. Vzorky a slepý pokus byly nanесeny po 10 μl . Slepý pokus představoval vzorek kontrolní skupiny inaktivovaný inkubací při 90 °C po dobu 20 minut. Všechny vzorky a slepý pokus byly nanесeny v duplikátech a doplněny testovacím pufrém s DTT na celkový objem 50 μl . Vždy jedna jamka z příslušné dvojice dodatečně obsahovala 1 μl trichostatinu A, selektivního inhibitoru histondeacetylas. Dále byla připravena reakční směs („Reaction Mix“)

smícháním testovacího pufru s DTT, roztoku substrátu a roztoku NAD^+ v poměru 18:1:1 a 40 μl této směsi bylo přidáno do všech jamek. Zakrytá 96-WP byla promíchána a inkubována 30 minut při teplotě 37 °C. Následně bylo do všech jamek kromě jamek s roztoky standardů přidáno 10 μl vyvíjejícího roztoku („Developer“). Zakrytá 96-WP byla opět promíchána, inkubována 10 minut při teplotě 37 °C a následně byla změřena fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 \text{ nm}$; Infinite® 200 PRO).

3.3.7 Stanovení koncentrace proteinů

Měření bylo provedeno za použití komerčního kitu DC Protein Assay, modifikované Lowryho metody. Jedná se o dvoustupňové kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů, které je však kompatibilní s detergenty. V prvním kroku dochází v zásaditém prostředí k reakci mezi proteinem a Cu^{2+} ionty a redukcí Cu^{2+} na Cu^+ . Společně s postranními řetězci některých aminokyselin (primárně tyrosin a tryptofan) Cu^+ redukuje Folinovo činidlo a vytváří tak modrý produkt, který se stanovuje měřením absorbance v oblasti 650–750 nm.¹⁴⁴

V prvním experimentu byla koncentrace proteinů měřena u vzorků z PM (4 h) (kapitola 3.3.2, str. 37) a měření bylo provedeno standardně za použití kyvet, ve druhém experimentu byla koncentrace měřena u vzorků z PM (4 h) a 6-WP (24 h) (kapitola 3.3.2, str. 37) a absorbance byla měřena v 96-WP za použití čtečky mikrotitračních destiček. Složení použitých roztoků shrnuje tabulka 3.3 na straně 43.

V prvním experimentu byly připraveny standardní roztoky BSA o koncentracích 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7 a 1,0 mg/ml (ředěno v RIPA pufru, kapitola 3.3.2, str. 37). Roztok A' byl připraven smícháním roztoku A a roztoku S v poměru 50:1. Jednotlivé vzorky a roztoky standardů byly naneseny do zkumavek po 100 μl v duplikátech. Postupně bylo do všech zkumavek přidáno 500 μl roztoku A', roztoky byly promíchány na laboratorní třepačce a opět do všech zkumavek bylo přidáno 4,0 ml roztoku B. Po promíchání na třepačce byly zkumavky inkubovány 15 minut při pokojové teplotě a absorbance byla měřena při 750 nm (Helios Gamma).

Ve druhém experimentu byly připraveny standardní roztoky BSA o koncentracích 0; 0,125; 0,250; 0,500; 0,750; 1,0; 1,5 a 2,0 mg/ml (ředěno v homogenizačním pufru, kapitola 3.3.6, str. 40). Roztok A' byl připraven smícháním roztoku A a roztoku S v poměru 50:1. Jednotlivé vzorky a roztoky standardů byly naneseny na 96-WP po 5 μl v duplikátech. Postupně bylo do všech jamek přidáno 25 μl roztoku A' a následně

200 μ l roztoku B. Po promíchání na výkyvné třepačce byla 96-WP inkubována 15 minut při pokojové teplotě a absorbance byla měřena při 630 nm (SunriseTM).

Tabulka 3.3

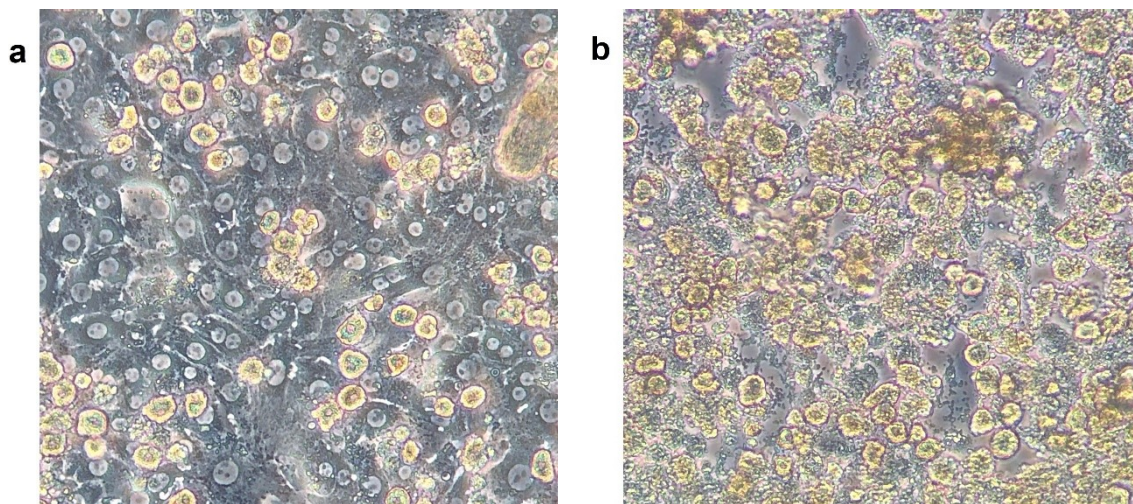
Složení roztoků pro stanovení koncentrace proteinů modifikovanou Lowryho metodou.

roztok	složení
A	1–5% hydroxid sodný, < 1% vinan sodný, < 0,1% síran měďnatý
B	Folinovo činidlo
S	5–10% dodecylsíran sodný

4 Výsledky

Nejprve byly izolovány hepatocyty z potkaních jater a primární kultury hepatocytů byly kultivovány s pracovními roztoky paracetamolu a modulátorů SIRT1 a AMPK. Pro modulaci aktivit byly využity roztoky aktivátorů a inhibitoru SIRT1 (CAY, CAY10591; SRT, SRT1720 a EX, EX-527) a roztoky aktivátoru a inhibitoru AMPK (AICAR a CC). Rozsah poškození hepatocytů byl určován jednak pomocí MTT testu, kdy byla měřena buněčná viabilita a jednak na základě stanovení aktivity ALT, které sloužilo k vyhodnocení rozsahu nekrózy hepatocytů. Rovněž byla určena koncentrace ALT metodou ELISA. V neposlední řadě byl zkoumán vliv modulátorů SIRT1 a AMPK na aktivitu SIRT1.

Pozorovaný rozdíl (Leica DM IL LED) mezi hepatocyty kultivovanými s čistým kompletním médiem a hepatocyty kultivovanými s roztokem paracetamolu je znázorněn na obrázku 4.1.

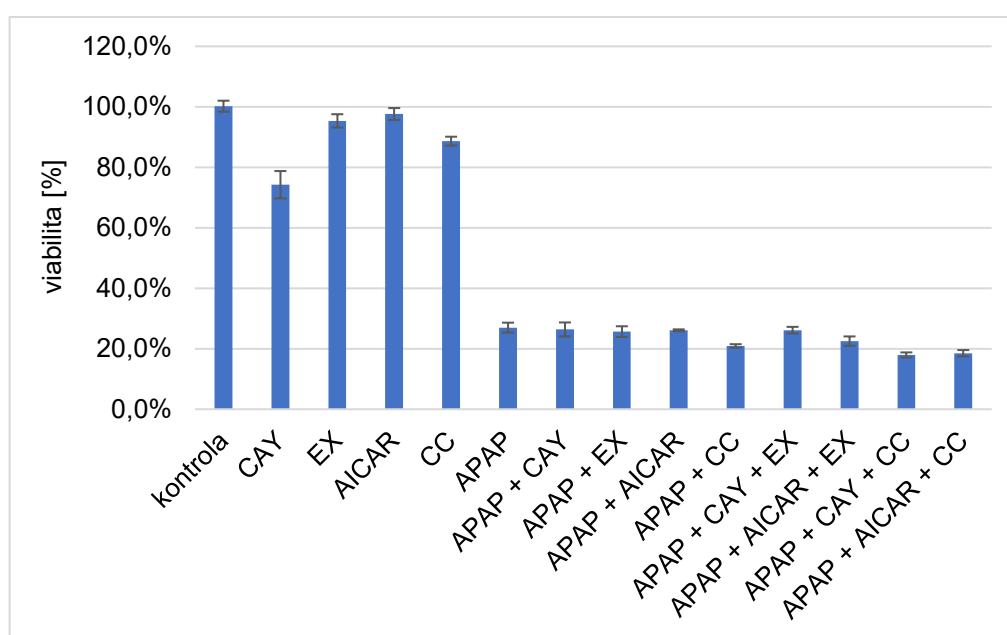


Obr. 4.1 Hepatocyty v prvním experimentu kultivované 24 hodin s pracovními roztoky, zvětšení 10×10. **a**, Vzorek kontrolní skupiny, hepatocyty kultivované s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO. **b**, Vzorek hepatocytů kultivovaných s 12,5mM roztokem paracetamolu.

4.1 Stanovení viability hepatocytů

Viabilita hepatocytů byla stanovena pomocí MTT testu u vzorků na 24-WP. V prvním experimentu byly vzorky kultivovány 24 hodin, ve druhém experimentu 4 hodiny a 24 hodin (kapitola 3.3.1, str. 35).

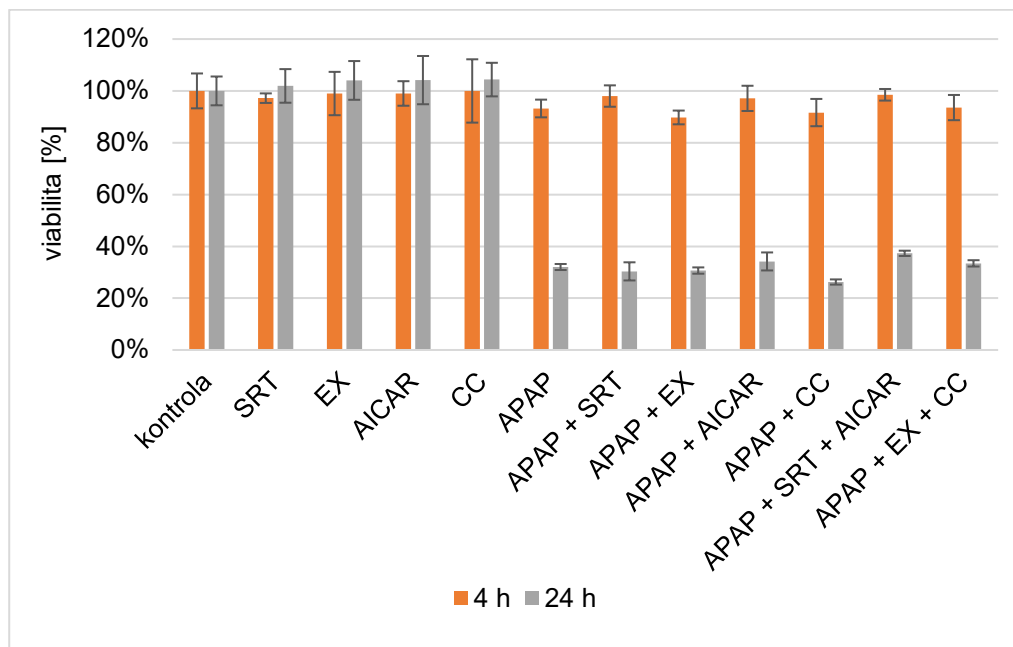
V prvním experimentu byla po 24hodinové kultivaci pozorovaná výrazná toxicita paracetamolu. Překvapivě byla poměrně výrazně snížena viabilita hepatocytů kultivovaných se samotným roztokem CAY. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami pracovních roztoků s paracetamolem nebyly téměř znatelné, pouze v případě roztoků obsahujících paracetamol s CC byl znatelný pokles viability. Přítomnost aktivátorů CAY a AICAR ve skupinách APAP + CAY a APAP + AICAR neměla vliv na sníženou viabilitu indukovanou paracetamolem. Nejvyšší pokles viability byl pozorován ve skupinách obsahujících roztok paracetamolu s CC v kombinaci s aktivátory CAY nebo AICAR (obr. 4.2).



Obr. 4.2 Stanovení viability hepatocytů. Měření bylo provedeno za použití hepatocytů z 24-WP kultivovaných 24 hodin s pracovními roztoky. Hepatotoxicitu byla indukována 12,5mM roztokem paracetamolu. Aktivita SIRT1 a AMPK byla modulována 30μM CAY, 50μM AICAR, 10μM EX a 10μM CC. Kontrolní skupina byla připravena kultivací hepatocytů s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO. Absorbance byla měřena při 540 nm. Data jsou uvedena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou.

Ve druhém experimentu se v případě 4hodinové kultivace jednotlivé skupiny od kontrolního skupiny lišily pouze slabě, viabilita hepatocytů kultivovaných s roztokem paracetamolu o nižší koncentraci byla mírně snížena. Nejnižší viabilita byla naměřena v případě skupin kultivovaných s roztokem paracetamolu společně s roztoky inhibitorů EX nebo CC. Kultivace po dobu 24 hodin se projevila prudkým poklesem viability u skupin s paracetamolem. Kombinace paracetamolu a CC byla spojena s nejnižší mírou viability hepatocytů, oproti tomu skupina hepatocytů kultivovaná s roztokem

paracetamolem a oběma aktivátory SRT a AICAR současně poskytl v rámci všech skupin s paracetamolem nejvyšší hodnoty viability. Kombinace paracetamolu a samotného SRT se na viabilitě neprojevila (obr. 4.3).

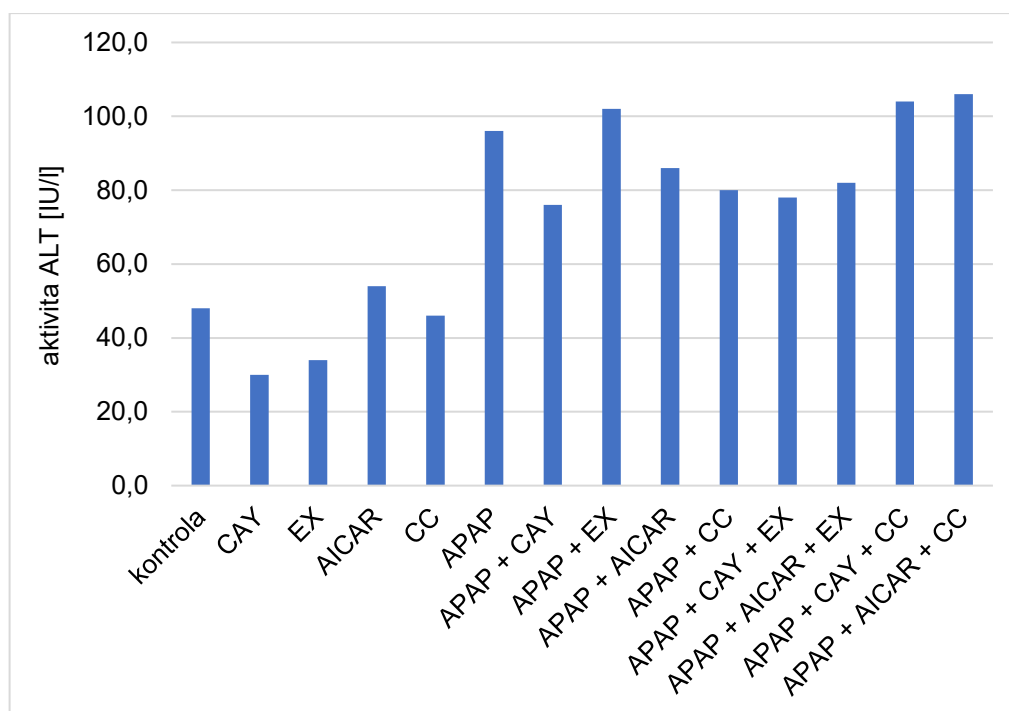


Obr. 4.3 Stanovení viability hepatocytů. Měření bylo provedeno za použití hepatocytů z 24-WP kultivovaných 4 hodiny a 24 hodin s pracovními roztoky. Hepatotoxicita byla indukována 10mM roztokem paracetamolu. Aktivita SIRT1 a AMPK byla modulována 10μM SRT, 50μM AICAR, 10μM EX a 10μM CC. Kontrolní skupina byla připravena kultivací hepatocytů s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO. Absorbance byla měřena při 540 nm. Data jsou uvedena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou.

4.2 Stanovení aktivity ALT

Aktivita ALT byla měřena za použití komerčního kitu ^LALT (GPT) kit. V prvním experimentu bylo ALT stanoveno u médií z 6-WP (24 h), ve druhém experimentu u médií z PM (4 h) a 6-WP (24 h) (kapitola 3.3.2, str. 37).

V prvním experimentu byla 24hodinová kultivace hepatocytů s roztoky obsahujícími paracetamol spojená s nárůstem aktivity ALT. Hepatocyty skupiny APAP + CAY vykazovaly sníženou aktivitu ALT, oproti tomu paracetamol v kombinaci s EX navodil mírné zvýšení aktivity ALT. Nejvyšší hodnoty aktivity ALT byly naměřeny ve skupinách hepatocytů kultivovaných s roztokem paracetamolu a CC v kombinaci s aktivátory CAY nebo AICAR. Aktivita ALT v roztoku paracetamolu s CC byla nižší než v případě samotného paracetamolu (obr. 4.4, str. 48).

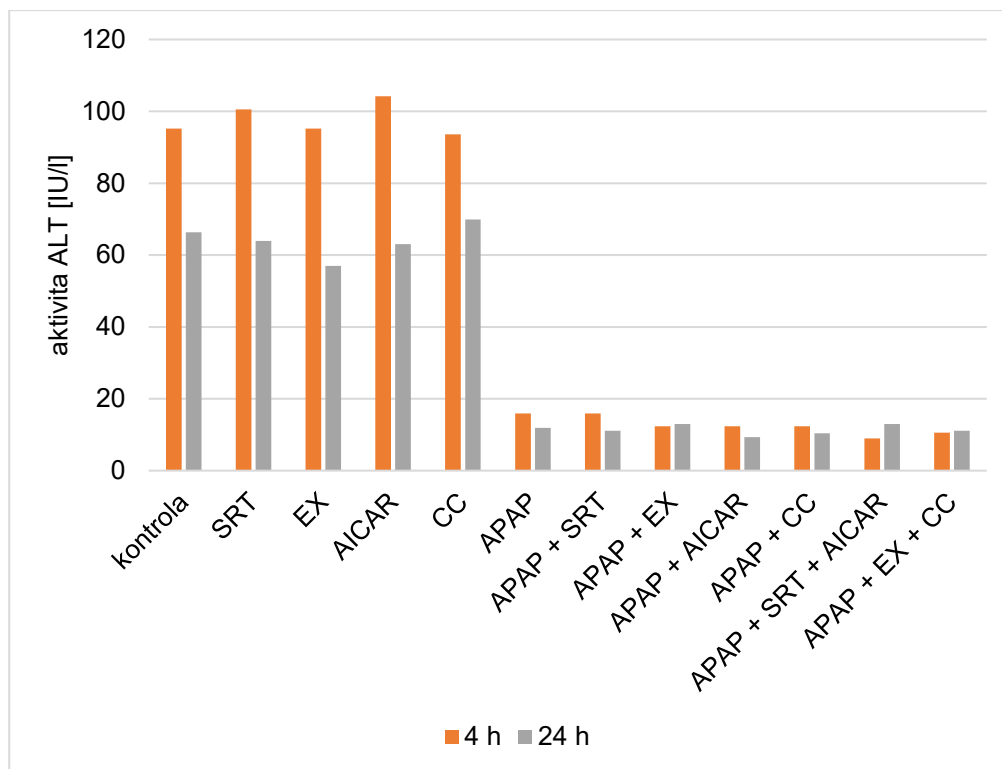


Obr. 4.4 Stanovení aktivity ALT. Měření bylo provedeno za použití médií z 6-WP kultivovaných 24 hodin s pracovními roztoky. Hepatotoxicitu byla indukována 12,5mM roztokem paracetamolu. Aktivita SIRT1 a AMPK byla modulována 30 μ M CAY, 50 μ M AICAR, 10 μ M EX a 10 μ M CC. Kontrolní skupina byla připravena kultivací hepatocytů s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO. Absorbance byla měřena při 340 nm.

Ve druhém experimentu byly v případě 4hodinové i 24hodinové kultivace pozorovány ve všech skupinách obsahujících paracetamol falešně nízké hodnoty aktivity ALT. Mezi jednotlivými skupinami s paracetamolem se hodnoty aktivity ALT téměř nelišily (obr. 4.5, str. 49).

4.3 Stanovení koncentrace ALT

Koncentrace ALT byla stanovena metodou ELISA pomocí komerčního kitu Rat ALT SimpleStep ELISA® Kit. Měření bylo provedeno pouze v rámci druhého experimentu, a to u médií z 6-WP kultivovaných 24 hodin s pracovními roztoky (kapitola 3.3.2, str. 37).

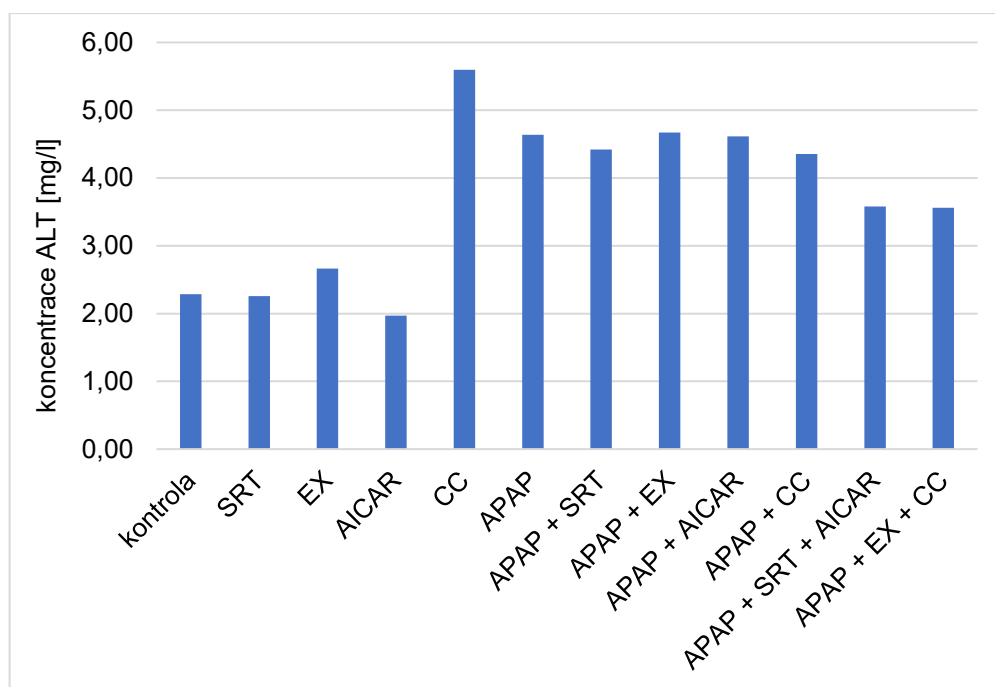


Obr. 4.5 Stanovení aktivity ALT. Měření bylo provedeno za použití médií z PM kultivovaných 4 hodiny a 6-WP kultivovaných 24 hodin s pracovními roztoky. Hepatotoxicita byla indukována 10mM roztokem paracetamolu. Aktivita SIRT1 a AMPK byla modulována 10 μ M SRT, 50 μ M AICAR, 10 μ M EX a 10 μ M CC. Kontrolní skupina byla připravena kultivací hepatocytů s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO. Absorbance byla měřena při 340 nm.

Přídavek jednotlivých roztoků modulátorů nijak výrazně neovlivnil koncentraci ALT ve vzorcích. Mezi skupinami s paracetamolem byl nejvýraznější pokles koncentrace ALT pozorován za přítomnosti obou aktivátorů (SRT a AICAR) nebo obou inhibitorů (EX a CC) současně. Kultivace se samotným roztokem CC byla spojena s největším nárůstem koncentrace ALT (obr. 4.6, str. 50).

4.4 Stanovení aktivity SIRT1

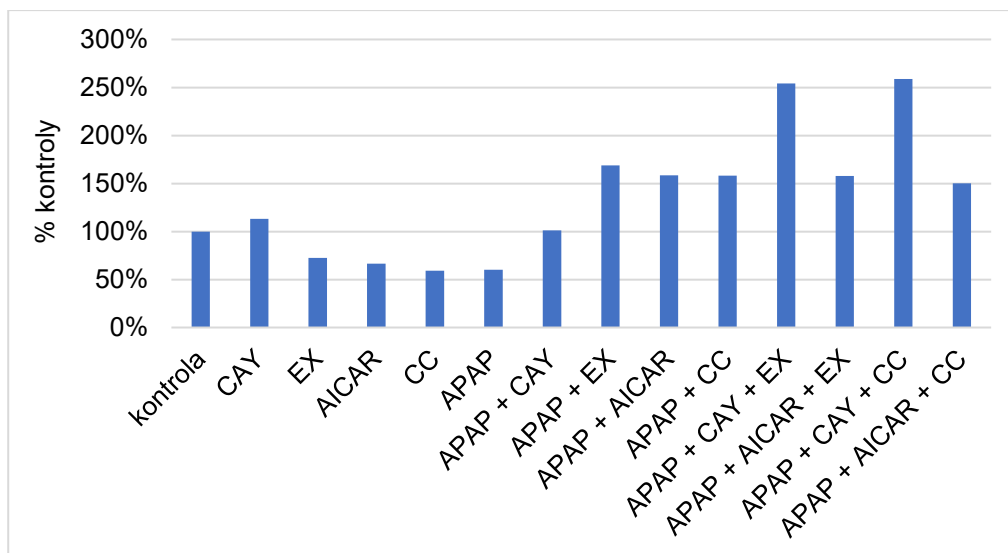
Aktivita SIRT1 byla stanovena za použití komerčních kitů SIRT1 Assay Kit v prvním experimentu a Sirtuin Activity Assay Kit (Fluorometric) ve druhém experimentu. V prvním experimentu byly měřeny vzorky hepatocytů z PM kultivované 4 hodiny, ve druhém experimentu vzorky z PM kultivované 4 hodiny a 6-WP kultivované 24 hodin (kapitola 3.3.2, str. 37). Aktivita SIRT1 byla na základě příslušných výsledků stanovení koncentrace proteinů převedena na specifickou aktivitu.



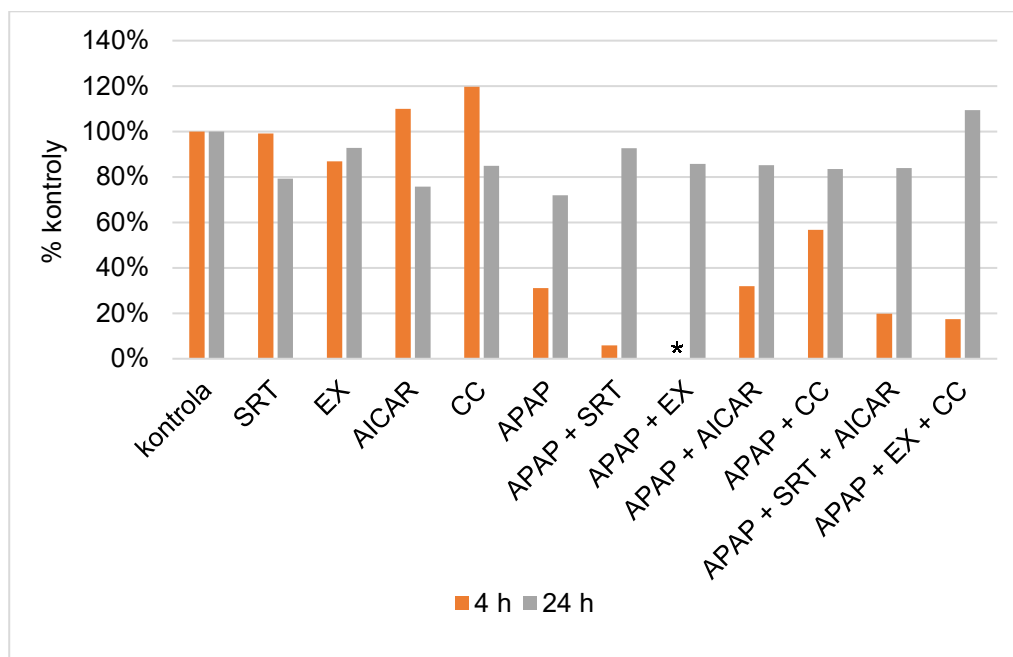
Obr. 4.6 Stanovení koncentrace ALT. Měření bylo provedeno za použití médií z 6-WP kultivovaných 24 hodin s pracovními roztoky. Hepatotoxicita byla indukována 10mM roztokem paracetamolu. Aktivita SIRT1 a AMPK byla modulována 10 μ M SRT, 50 μ M AICAR, 10 μ M EX a 10 μ M CC. Kontrolní skupina byla připravena kultivací hepatocytů s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO. Absorbance byla měřena při 450 nm s referenční vlnovou délkou 630 nm.

V prvním experimentu navodila kultivace hepatocytů s roztokem CAY mírné zvýšení specifické aktivity SIRT1, a to jak v případě samotného roztoku CAY, tak v kombinaci s roztokem paracetamolu. Kultivace s roztokem paracetamolu se projevila poklesem specifické aktivity SIRT1. Všechny následující skupiny počínaje kombinací APAP + EX poskytly výrazně vyšší hodnoty specifické aktivity SIRT1 (obr. 4.7, str. 51).

Ve druhém experimentu byl zaznamenán výrazný pokles specifické aktivity SIRT1 ve skupinách s paracetamolem kultivovaných 4 hodiny. Po 24hodinové kultivaci nebyl pokles v těchto skupinách tolik znatelný. Kultivace hepatocytů se samotným roztokem SRT i se SRT v kombinaci s roztokem paracetamolu po dobu 4 hodin se projevila snížením specifické aktivity SIRT1. Pokles specifické aktivity SIRT1 po 24hodinové kultivaci byl nejvyšší v případě samotného roztoku paracetamolu (obr. 4.8, str. 51).



Obr. 4.7 Stanovení aktivity SIRT1. Měření bylo provedeno za použití vzorků z PM kultivovaných 4 hodiny s pracovními roztoky. Hepatotoxicita byla indukována 12,5mM roztokem paracetamolu. Aktivita SIRT1 a AMPK byla modulována 30 μ M CAY, 50 μ M AICAR, 10 μ M EX a 10 μ M CC. Kontrolní skupina byla připravena kultivací hepatocytů s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO. Fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm. Výsledky jsou uvedeny jako specifická aktivita vyjádřená procentuálně vzhledem ke kontrolní skupině.



Obr. 4.8 Stanovení aktivity SIRT1. Měření bylo provedeno za použití vzorků z PM kultivovaných 4 hodiny a 6-WP kultivovaných 24 hodin s pracovními roztoky. Hepatotoxicita byla indukována 10,5mM roztokem paracetamolu (APAP). Aktivita SIRT1 a AMPK byla modulována 10 μ M SRT, 50 μ M AICAR, 10 μ M EX a 10 μ M CC. Kontrolní skupina byla připravena kultivací hepatocytů s čistým kompletním médiem s 5% FBS a 0,5% DMSO. Fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 400 nm a emisní vlnové délce 505 nm. Výsledky jsou uvedeny jako specifická aktivita vyjádřená procentuálně vzhledem ke kontrolní skupině. * Hodnota RFU pro skupinu APAP + EX kultivovanou 4 hodiny byla příliš nízká, hodnota specifické aktivity byla záporná (-31 %). RFU; relativní fluorescenční jednotka.

5 Diskuze

Mezi hlavní závěry této práce patří zjištění, že CAY10591 působí hepatoprotektivně, zřejmě prostřednictvím SIRT1. Výsledky kromě toho naznačují, že ačkoliv AICAR rovněž zmírňuje hepatotoxicitu indukovanou paracetamolem, mechanismus jeho účinku je nezávislý na SIRT1. Vzájemná propojenost SIRT1 a AMPK nebyla prokázána.

Podle očekávání byla viabilita hepatocytů ve vzorcích kultivovaných 24 hodin s roztoky paracetamolu výrazně snížena. Výsledky MTT testu však naznačují, že 4hodinová kultivace není dostatečně dlouhá pro vyčerpání buněčných zásob GSH a tvorbu NAPQI (obr. 4.3, str. 47). Z výsledků můžeme rovněž usuzovat, že koncentrace paracetamolu 12,5 mM, která byla v prvním experimentu využita k indukci hepatocytárního poškození je příliš vysoká a potenciální hepatoprotektivní účinky modulátorů SIRT1 a AMPK se při této koncentraci nemusí projevit. Přídavek modulátorů k 12,5mM roztoku paracetamolu ani v jedné skupině nenavodil zvýšení viability (obr. 4.2, str. 46), a proto byla ve druhém experimentu koncentrace paracetamolu snížena na 10 mM. V případě 10mM roztoku paracetamolu byla zvýšená viabilita naměřena u třech skupin. K nárůstu viability došlo v případě kombinace aktivátorů SRT a AICAR a viabilita byla také mírně zvýšena ve skupině APAP + AICAR (obr. 4.3, str. 47). Kombinace paracetamolu a CC byla u obou 24hodinových kultivací spojena s nejvýraznějším poklesem viability. Negativní dopad CC na viabilitu hepatocytů odpovídá výsledkům studie z roku 2019.⁷¹ Kultivace hepatocytů s roztokem paracetamolu v kombinaci s EX se neprojevila sníženou viabilitou (obr. 4.2, str. 46; obr. 4.3, str. 47), což je v rozporu s výsledky studie z roku 2020.⁷⁰ Stanovení viability pomocí MTT testu má nicméně jistá omezení. Aktivita mitochondriálních enzymů může být zvýšená v raných fázích apoptózy a buňky tak mohou vykazovat falešně zvýšené hodnoty viability.¹⁴⁵ Výsledky MTT testu také závisí na počtu nanesených buněk. Odchyly mezi počty buněk jsou kromě toho výraznější na 24-WP než na kultivačních plotnách o větší ploše.

Stanovení aktivity ALT bylo provedeno pro porovnání výsledků MTT testu. Hodnoty aktivity ALT v případě samotného roztoku CC a kombinace CC s paracetamolem byly sníženy a neodpovídají tak poklesu viability u těchto skupin. Naměřená aktivita ALT pro skupiny APAP + CAY + CC a APAP + AICAR + CC oproti tomu

koreluje s výsledky MTT testu. V těchto skupinách došlo k nejvýraznějšímu nárůstu aktivity ALT a současně k největšímu poklesu viability (obr. 4.4, str. 48; obr. 4.2, str. 46). Navzájem si také odpovídají výsledky pro skupiny APAP + AICAR a APAP + AICAR + EX v rámci měření aktivity ALT se skupinami APAP + AICAR a APAP + SRT + AICAR při stanovení viability. Ve zmíněných skupinách byl zaznamenán pokles aktivity ALT, resp. nárůst viability oproti hepatocytům kultivovaným se samotným roztokem paracetamolu (obr. 4.4, str. 48; obr. 4.3, str. 47). Tyto výsledky naznačují, že by se AICAR mohl podílet na ochraně hepatocytů před toxickým poškozením jater a shodují se se závěry studie z roku 2016.¹⁴⁶ Hepatocyty kultivované se samotným roztokem CAY a s roztokem CAY v kombinaci s paracetamolem vykazovaly snížené hodnoty aktivity ALT. Tyto výsledky poukazují na potenciální hepatoprotektivní účinek aktivátoru CAY, který je v souladu se studií z roku 2015.⁴ Hodnota aktivity ALT pro skupinu APAP + EX byla zvýšená oproti skupině se samotným paracetamolem a ukazuje tak možný negativní dopad inhibitoru EX na paracetamolem poškozené hepatocyty, který je podporován výsledky dvou studií.^{1,70} Přídavek roztoků CAY nebo AICAR ke skupině APAP + EX se navíc projevil poměrně výrazným poklesem aktivity ALT (obr. 4.4, str. 49). Diskutované výsledky jsou nicméně pouze přibližné, jelikož se pracovalo se směsnými vzorky. Druhé stanovení aktivity ALT poskytlo falešně nízké hodnoty ve všech vzorcích kultivovaných s roztokem paracetamolu. Jedním z možných vysvětlení snížených hodnot aktivity ALT je přítomnost metabolitů paracetamolu, jejichž absorpční maximum se pohybuje kolem vlnové délky 340 nm. Léčivo sulfasalazin a jeho metabolit sulfapyridin jsou například spojovány s interferencí s určitými spektrofotometrickými stanoveními. Obě sloučeniny totiž vykazují silnou absorbanci při 340 nm, která je využívána při měření koncentrace NADH a NADPH, například v rámci stanovení aktivity ALT.¹⁴⁷

Jako doplňující měření pro druhou 24hodinovou kultivaci byla metodou ELISA stanovena koncentrace ALT (obr. 4.6, str. 50). S výjimkou skupin CC a APAP + CC výsledky odpovídají hodnotám naměřeným pomocí MTT testu (obr. 4.3, str. 47). Uváděné výsledky jsou však pouze přibližné, jelikož vzorky médií nebyly dostatečně naředěny a hodnoty absorbancí přesáhly hodnotu 2, pro které již není závislost absorbance na koncentraci lineární.

Aktivita SIRT1 byla zvýšena ve vzorcích kultivovaných se samotným roztokem CAY a s roztokem CAY v kombinaci s paracetamolem. Tyto výsledky tak podporují závěry ze stanovení aktivity ALT, které naznačují hepatoprotektivní působení

aktivátoru CAY. Na druhou stranu není vyloučeno, že CAY působí hepatoprotektivně prostřednictvím AMPK. Kultivace hepatocytů se samotným roztokem paracetamolu se ve všech měřeních projevila poklesem aktivity SIRT1 a výsledky tak ukazují, že paracetamol pravděpodobně inhibuje SIRT1. Stejně tak v jiné studii paracetamol inhiboval aktivitu superoxiddismutasy a glutathionperoxidasy.¹⁴⁸ Toxický účinek paracetamolu tak může být dvojího charakteru a to jednak indukci oxidativního stresu a jednak inhibicí cytoprotektivních enzymů. U druhé poloviny vzorků v rámci prvního stanovení aktivity SIRT1 došlo k poměrně výraznému nárůstu aktivity oproti první polovině vzorků. Prvních sedm skupin bylo nanášeno do první řady mikrotitrační destičky, dalších sedm do řady druhé (obr. 4.7, str. 51). Zvýšení hodnot aktivity SIRT1 bylo zčásti zapříčiněné mírným nárůstem koncentrací proteinů ve vzorcích s paracetamolem, ale výraznější výkyvy v koncentracích nebyly na základě stanovení modifikovanou Lowryho metodou pozorovány. Důvodem tohoto skokového nárůstu hodnot mohl být okrajový efekt mikrotitrační destičky (z angl. *microplate edge effect*). Jedná se o jev, při kterém během inkubace dojde k částečnému vypaření média z jamek podél obvodu destičky, a tudíž k rozdílu mezi obsahy jamek v závislosti na vzdálenosti od jejího středu. Tento problém by mohla alespoň částečně eliminovat inkubace mikrotitrační destičky při vlhkosti blízké se 100 %. V rámci druhého stanovení aktivity SIRT1 došlo při 4hodinové kultivaci k výraznému snížení aktivity ve skupinách kultivovaných s roztokem paracetamolu, kterému také odpovídal výrazný pokles koncentrace proteinů u těchto skupin. Zde vyvstávají nesrovnalosti v porovnání s prvním stanovením koncentrace proteinů. Na základě výsledků této práce jsou hepatoprotektivní účinky aktivátoru AICAR nejspíše spojeny s aktivací AMPK, avšak nejsou závislé na aktivitě SIRT1. Výsledky studie z roku 2011,¹⁴⁹ podle kterých je AICAR schopný zvyšovat aktivitu SIRT1 tak nebyly potvrzeny.

6 Souhrn

Předkládaná práce se zabývala studiem potenciálních hepatoprotektivních účinků modulátorů SIRT1 a AMPK a vzájemné propojenosti obou enzymů. Na základě výsledků byly vyvozeny tyto závěry:

- CAY10591 působil hepatoprotektivně a to pravděpodobně prostřednictvím aktivace SIRT1.
- Hepatoprotektivní účinky byly pozorovány i po vystavení hepatocytů roztoku AICAR, avšak jeho vliv je na SIRT1 nezávislý.
- Za dostupných podmínek měření se vztah mezi studovanými enzymy nepodařilo prokázat.

Tato práce shrnuje výsledky pilotních experimentů, pro jejichž ověření je nutné dané experimenty ještě minimálně dvakrát zopakovat.

Seznam použité literatury

1. Farghali, H., Kemelo, M. K. & Kutinová Canová, N. SIRT1 Modulators in Experimentally Induced Liver Injury. *Oxid Med Cell Longev* **12**, 1–15 (2019).
2. Ehrmann, J., Aiglová, K., Vrzalová, D., Aiglová, R., Konečný, M. & Procházka, V. Mimožatrní projevy NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease, nealkoholové postižení jater při steatóze). Jde o příčinnou souvislost? *Interní medicína pro praxi* **19**, 72–77 (2017).
3. Rada, P., Pardo, V., Mobasher, M. A., García-Martínez, I., Ruiz, L., González-Rodríguez, Á., Sanchez-Ramos, C., Muntané, J., Alemany, S., James, L. P., Simpson, K. J., Monsalve, M., Valdecantos, M. P. & Valverde, Á. M. SIRT1 Controls Acetaminophen Hepatotoxicity by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* **28**, 1187–1208 (2017).
4. Wojnarová, L., Kutinová Canová, N., Farghali, H. & Kučera, T. Sirtuin 1 modulation in rat model of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Physiol Res* **64**, S477–S487 (2015).
5. Yan, T., Huang, J., Nisar, M. F., Wan, C. & Huang, W. The Beneficial Roles of SIRT1 in Drug-Induced Liver Injury. *Oxid Med Cell Longev* **12**, 1–14 (2019).
6. Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J. Y., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B. J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J. S., Hubbard, B. P., Varela, A. T., Davis, J. G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A. P., Coppari, R., Palmeira, C. M., de Cabo, R., Baur, J. A. & Sinclair, D. A. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab* **15**, 675–690 (2012).
7. Ruderman, N. B., Julia Xu, X., Nelson, L., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., Lan, F. & Ido, Y. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E751–E760 (2010).
8. Jeon, S.-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* **48**, e245 (2016).
9. Song, Y. M., Lee, Y., Kim, J.-W., Ham, D.-S., Kang, E.-S., Cha, B. S., Lee, H. C. & Lee, B.-W. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy* **11**, 46–59 (2014).
10. Shu, Y., He, D., Li, W., Wang, M., Zhao, S., Liu, L., Cao, Z., Liu, R., Huang, Y., Li, H., Yang, X., Lu, C. & Liu, Y. Hepatoprotective Effect of Citrus aurantium L. Against APAP-induced Liver Injury by Regulating Liver Lipid Metabolism and Apoptosis. *Int J Biol Sci* **16**, 752–765 (2020).
11. Salomone, F., Barbagallo, I., Godos, J., Lembo, V., Currenti, W., Cinà, D., Avola, R., D’Orazio, N., Morisco, F., Galvano, F. & Li Volti, G. Silibinin Restores NAD⁺

- Levels and Induces the SIRT1/AMPK Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver. *Nutrients* **9**, 1086–1097 (2017).
12. Yang, Y., Bai, T., Yao, Y.-L., Zhang, D.-Q., Wu, Y.-L., Lian, L.-H. & Nan, J.-X. Upregulation of SIRT1-AMPK by thymoquinone in hepatic stellate cells ameliorates liver injury. *Toxicol Lett* **262**, 80–91 (2016).
 13. Alempijevic, T., Zec, S. & Milosavljevic, T. Drug-induced liver injury: Do we know everything? *World J Hepatol* **9**, 491–502 (2017).
 14. Válek, V., Kala, Z., Kiss, I. & kol. *Maligní ložiskové procesy jater: Diagnostika a léčba včetně minimálně invazivních metod*. Praha, Grada Publishing, 2006.
 15. Naňka, O., Elišková, M. & Eliška, O. *Přehled anatomie*. Praha, Galén 2015.
 16. Mahadevan, V. Anatomy of the liver. *Surgery (Oxford)* (2014)
 17. Ehrmann, J. & Hůlek, P. *Hepatologie*. Praha: Grada Publishing, 2010.
 18. Abdel-Misih, S. R. Z. & Bloomston, M. Liver Anatomy. *Surg Clin North Am* **90**, 643–653 (2010).
 19. Tortora, G. J. & Derrickson, B. *Principles of Anatomy and Physiology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2014.
 20. Krishna, M. Microscopic anatomy of the liver. *Clin Liver Dis* **2**, S4–S7 (2013).
 21. Wikimedia Commons: *Liver Anterior View with Surrounding Structures.jpg*. Dostupné z URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Liver_Anterior_View_with_Surrounding_Structures.jpg> [cit. 9. 5. 2020].
 22. Wikimedia Commons: *Liver Posterior View with Surrounding Structures.jpg*. Dostupné z URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Liver_Posterior_View_with_Surrounding_Structures.jpg> [cit. 9. 5. 2020].
 23. OpenStax: *23.6 Accessory Organs in Digestion: The Liver, Pancreas, and Gallbladder*. Dostupné z URL: <<https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/23-6-accessory-organs-in-digestion-the-liver-pancreas-and-gallbladder>> [cit. 9. 5. 2020].
 24. Kmiec, Z. *Cooperation of Liver Cells in Health and Disease*. Heidelberg: Springer, 2001.
 25. Crawford, J. M., Bioulac-Sage, P. & Hytioglou, P. 1 - Structure, Function, and Responses to Injury. in *Macswen's Pathology of the Liver (Seventh Edition)* (eds. Burt, A. D., Ferrell, L. D. & Hübscher, S. G.) Filadelfie: Elsevier, 2018, 1–87. ISBN 978-0-7020-6697-9.
 26. Pavelka, M. & Roth, J. Glycogen. in *Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology* (eds. Pavelka, M. & Roth, J.) Vídeň: Springer, 2010, 140–140. ISBN 978-3-211-99389-7.
 27. Peeters, A., Shinde, A. B., Dirkx, R., Smet, J., De Bock, K., Espeel, M., Vanhorebeek, I., Vanlander, A., Van Coster, R., Carmeliet, P., Franssen, M., Van

- Veldhoven, P. P. & Baes, M. Mitochondria in peroxisome-deficient hepatocytes exhibit impaired respiration, depleted DNA, and PGC-1 α independent proliferation. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 285–298 (2015).
28. Stolz, D. B. Sinusoidal Endothelial Cells. in *Molecular Pathology of Liver Diseases* (ed. Monga, S. P. S.) Boston: Springer US, 2011, 97–107. ISBN 978-1-4419-7107-4.
 29. Wisse, E., Zanger, R. B. de, Charels, K., Smissen, P. van der & McCuskey, R. S. The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of disse. *Hepatology* **5**, 683–692 (1985).
 30. McGuire, R. F., Bissell, D. M., Boyles, J. & Roll, F. J. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* **15**, 989–997 (1992).
 31. Wisse, E., Braet, F., Luo, D., De Zanger, R., Jans, D., Crabbé, E. & Vermoesen, A. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol* **24**, 100–111 (1996).
 32. Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* **26**, 1175–1186 (2006).
 33. Knolle, P. A., Uhrig, A., Protzer, U., Trippler, M., Duchmann, R., Meyer zum Büschenfelde, K. H. & Gerken, G. Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology* **27**, 93–99 (1998).
 34. Gandhi, C. R. Stellate Cells. in *Molecular Pathology of Liver Diseases* (ed. Monga, S. P. S.) 53–79 Boston: Springer, 2011, 53–79. ISBN 978-1-4419-7107-4.
 35. Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **88**, 125–172 (2008).
 36. Friedman, S. L. The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis – Mechanisms and Treatment Strategies. *N Engl J Med* **328**, 1828–1835 (1993).
 37. Karpen, S. J. & Crawford, J. M. Cellular and molecular biology of the liver. *Curr Opin Gastroenterol* **15**, 184–191 (1999).
 38. Luo, D.-Z., Vermijlen, D., Ahishali, B., Triantis, V., Plakoutsi, G., Braet, F., Vanderkerken, K. & Wisse, E. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. *World J Gastroenterol* **6**, 1–11 (2000).
 39. Han, Y., Glaser, S., Meng, F., Francis, H., Marzioni, M., McDaniel, K., Alvaro, D., Venter, J., Carpino, G., Onori, P., Gaudio, E., Alpini, G. & Franchitto, A. Recent advances in the morphological and functional heterogeneity of the biliary epithelium. *Exp Biol Med* **238**, 549–565 (2013).
 40. Kono, N. & Nakanuma, Y. Ultrastructural and immunohistochemical studies of the intrahepatic peribiliary capillary plexus in normal livers and extrahepatic biliary obstruction in human beings. *Hepatology* **15**, 411–418 (1992).

41. Frevert, U., Engelmann, S., Zougbedé, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. & Yee, H. Intravital Observation of *Plasmodium berghei* Sporozoite Infection of the Liver. *PLOS Biology* **3**, 1034–1046 (2005).
42. Charlton, M. R. Protein metabolism and liver disease. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* **10**, 617–635 (1996).
43. Rigby, S. H. & Schwarz, K. B. CHAPTER 39 - Nutrition and Liver Disease. in *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease* (eds. Coulston, A. M., Rock, C. L. & Monsen, E. R.) San Diego: Academic Press, 2001, 601–613. ISBN 978-0-12-193155-1.
44. Cowell, R. L., Beaudin, S. & Meinkoth, J. H. 44 - Liver Cytology. in *Veterinary Clinical Pathology Secrets* (ed. Cowell, R. L.) Saint Louis: Elsevier Mosby, 2004, 258–263. ISBN 978-1-56053-633-8.
45. Chiang, J. Y. L. Bile Acid Metabolism. in *Molecular Pathology of Liver Diseases* (ed. Monga, S. P. S.) Boston: Springer, 2011, 165–179. ISBN 978-1-4419-7107-4.
46. Tennant, B. C. & Center, S. A. Chapter 13 - Hepatic Function. in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)* (eds. Kaneko, J. J., Harvey, J. W. & Bruss, M. L.) San Diego: Academic Press, 2008, 379–412. ISBN 978-0-12-370491-7.
47. Lehman-McKeeman, L. D. & Ruepp, S. U. Chapter 2 - Biochemical and Molecular Basis of Toxicity. in *Fundamentals of Toxicologic Pathology (Third Edition)* (eds. Wallig, M. A., Haschek, W. M., Rousseaux, C. G. & Bolon, B.) London: Academic Press, 2017, 15–33. ISBN 978-0-12-809841-7.
48. Dowd, F. J. 2 - Pharmacokinetics: The Absorption, Distribution, and Fate of Drugs * The author wishes to recognize Dr. John A. Yagiela for his past contributions to this chapter. in *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)* (eds. Dowd, F. J., Johnson, B. S. & Mariotti, A. J.) Saint Louis: Elsevier Mosby, 2017, 15–43. ISBN 978-0-323-39307-2.
49. Pathways of Biotransformation — Phase I Reactions. in *Drug Metabolism: Current Concepts* (eds. Ionescu, C. & Caira, M. R.) Dordrecht: Springer, 2005, 41–128. ISBN 978-1-4020-4142-6.
50. Singh, R. & Geetanjali. Chapter 14 - Exploring Flavin as Catalyst for the Remediation of Halogenated Compounds. in *New and Future Developments in Catalysis* (ed. Suib, S. L.) Amsterdam: Elsevier, 2013, 421–440. ISBN 978-0-444-53870-3.
51. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca Jr, J., Martínek, V. & Páca, J. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem Listy* **98**, 876–890 (2004).
52. Parkinson, A. & Ogilvie, B. W. Biotransformation of Xenobiotics. in *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology* New York: McGraw-Hill, 2003.

53. Kemper, R. A., Hayes, J. R. & Bogdanffy, M. S. Metabolism: A Determinant of Toxicity. in *Principles and Methods of Toxicology* 103–178 New York: Informa Healthcare, 2008, 103–178. ISBN 978-0-8493-3778-9.
54. Graham, G. G., Davies, M. J., Day, R. O., Mohamudally, A. & Scott, K. F. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacol* **21**, 201–232 (2013).
55. Prescott, L. F. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br J Clin Pharmacol* **10**, 291S–298S (1980).
56. Hodgman, M. J. & Garrard, A. R. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin* **28**, 499–516 (2012).
57. Bessems, J. G. M. & Vermeulen, N. P. E. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. *Critical Reviews in Toxicology* **31**, 55–138 (2001).
58. Prescott, L. F. Paracetamol Overdosage. *Drugs* **25**, 290–314 (1983).
59. Morris, M. E. & Levy, G. Renal Clearance and Serum Protein Binding of Acetaminophen and Its Major Conjugates in Humans. *J Pharm Sci* **73**, 1038–1041 (1984).
60. Wikimedia Commons: *Paracetamol metabolism (de).png*. Dostupné z URL: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paracetamol_metabolism_\(de\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paracetamol_metabolism_(de).png)> [cit. 12. 5. 2020].
61. Mazaleuskaya, L. L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., FitzGerald, G. A., Altman, R. B. & Klein, T. E. PharmGKB summary: Pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenet Genomics* **25**, 416–426 (2015).
62. James, L. P., Mayeux, P. R. & Hinson, J. A. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* **31**, 1499–1506 (2003).
63. Athersuch, T. J., Antoine, D. J., Boobis, A. R., Coen, M., Daly, A. K., Possamai, L., Nicholson, J. K. & Wilson, I. D. Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective. *Toxicol Res* **7**, 347–357 (2018).
64. Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W. A., Han, D. & Kaplowitz, N. Role of JNK Translocation to Mitochondria Leading to Inhibition of Mitochondria Bioenergetics in Acetaminophen-induced Liver Injury. *J Biol Chem* **283**, 13565–13577 (2008).
65. Bajt, M. L., Cover, C., Lemasters, J. J. & Jaeschke, H. Nuclear Translocation of Endonuclease G and Apoptosis-Inducing Factor during Acetaminophen-Induced Liver Cell Injury. *Toxicol Sci* **94**, 217–225 (2006).
66. Krenkel, O., Mossanen, J. C. & Tacke, F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surg Nutr* **3**, 331–343 (2014).

67. Kubes, P. & Mehal, W. Z. Sterile Inflammation in the Liver. *Gastroenterology* **143**, 1158–1172 (2012).
68. Saito, C., Zwingmann, C. & Jaeschke, H. Novel Mechanisms of Protection Against Acetaminophen Hepatotoxicity in Mice by Glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* **51**, 246–254 (2010).
69. Karnewar, S., Neeli, P. K., Panuganti, D., Kotagiri, S., Mallappa, S., Jain, N., Jerald, M. K. & Kotamraju, S. Metformin regulates mitochondrial biogenesis and senescence through AMPK mediated H3K79 methylation: Relevance in age-associated vascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta* **1864**, 1115–1128 (2018).
70. Zhao, L., Zhang, J., Hu, C., Wang, T., Lu, J., Wu, C., Chen, L., Jin, M., Ji, G., Cao, Q. & Jiang, Y. Apigenin Prevents Acetaminophen-Induced Liver Injury by Activating the SIRT1 Pathway. *Front Pharmacol* **11**, 1–13 (2020).
71. Lv, H., Hong, L., Tian, Y., Yin, C., Zhu, C. & Feng, H. Corilagin alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via enhancing the AMPK/GSK3 β -Nrf2 signaling pathway. *Cell Commun Signal* **17**, 1–15 (2019).
72. Jung, J. Y., Lee, C. W., Park, S. M., Jegal, K. H., Kim, J. K., Park, C. A., Cho, I. J., Jung, D. H., An, W. G., Ku, S. K., Zhao, R. & Kim, S. C. Activation of AMPK by *Buddleja officinalis* Maxim. Flower Extract Contributes to Protecting Hepatocytes from Oxidative Stress. *Evid Based Complement Alternat Med* **10**, 1–15 (2017).
73. Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P. & Auwerx, J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–1060 (2009).
74. Bonkowski, M. S. & Sinclair, D. A. Slowing ageing by design: the rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 679–690 (2016).
75. Kawashima, T., Inuzuka, Y., Okuda, J., Kato, T., Niizuma, S., Tamaki, Y., Iwanaga, Y., Kawamoto, A., Narazaki, M., Matsuda, T., Adachi, S., Takemura, G., Kita, T., Kimura, T. & Shioi, T. Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondria and reduces cardiac function in mice. *J Mol Cell Cardiol* **51**, 1026–1036 (2011).
76. Blokker, B. A., Maijo, M., Echeandia, M., Galduroz, M., Patterson, A. M., Ten, A., Philo, M., Schungel, R., Gutierrez-de Juan, V., Halilbasic, E., Fuchs, C., Le Gall, G., Milkiewicz, M., Milkiewicz, P., Banales, J. M., Rushbrook, S. M., Mato, J. M., Trauner, M., Müller, M., Martínez-Chantar, M. L., Varela-Rey, M. & Beraza, N. Fine-Tuning of Sirtuin 1 Expression Is Essential to Protect the Liver From Cholestatic Liver Disease. *Hepatology* **69**, 699–716 (2019).
77. Hao, C., Zhu, P.-X., Yang, X., Han, Z.-P., Jiang, J.-H., Zong, C., Zhang, X.-G., Liu, W.-T., Zhao, Q.-D., Fan, T.-T., Zhang, L. & Wei, L.-X. Overexpression of SIRT1 promotes metastasis through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **14**, 1–10 (2014).

78. Sauve, A. A., Celic, I., Avalos, J., Deng, H., Boeke, J. D. & Schramm, V. L. Chemistry of gene silencing: the mechanism of NAD⁺-dependent deacetylation reactions. *Biochemistry* **40**, 15456–15463 (2001).
79. Dai, H., Case, A. W., Riera, T. V., Considine, T., Lee, J. E., Hamuro, Y., Zhao, H., Jiang, Y., Sweitzer, S. M., Pietrak, B., Schwartz, B., Blum, C. A., Disch, J. S., Caldwell, R., Szczepankiewicz, B., Oalman, C., Yee Ng, P., White, B. H., Casaubon, R., Narayan, R., Koppetsch, K., Bourbonais, F., Wu, B., Wang, J., Qian, D., Jiang, F., Mao, C., Wang, M., Hu, E., Wu, J. C., Perni, R. B., Vlasuk, G. P. & Ellis, J. L. Crystallographic structure of a small molecule SIRT1 activator-enzyme complex. *Nat Commun* **6**, 1–10 (2015).
80. Yuan, H. & Marmorstein, R. Structural Basis for Sirtuin Activity and Inhibition. *J Biol Chem* **287**, 42428–42435 (2012).
81. Chen, L., Feng, Y., Zhou, Y., Zhu, W., Shen, X., Chen, K., Jiang, H. & Liu, D. Dual role of Zn²⁺ in maintaining structural integrity and suppressing deacetylase activity of SIRT1. *J Inorg Biochem* **104**, 180–185 (2010).
82. Harrison, S. C. Peptide–Surface Association: The Case of PDZ and PTB Domains. *Cell* **86**, 341–343 (1996).
83. Denu Lab: *Sirtuins and reversible acetylation*. Dostupné z URL: <<https://denulab.discovery.wisc.edu/research/reversibleacetylation/>> [cit. 6. 6. 2020].
84. Hori, Y. S., Kuno, A., Hosoda, R. & Horio, Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. *PLOS ONE* **8**, e73875 (2013).
85. Cantó, C. & Auwerx, J. PGC-1α, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* **20**, 98–105 (2009).
86. Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace, A. J., DiStefano, P. S., Chiang, L. W. & Greenberg, M. E. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* **296**, 530–534 (2002).
87. Hollander, M. C., Philburn, R. T., Patterson, A. D., Wyatt, M. A. & Fornace, A. J. Genomic instability in Gadd45a^{-/-} cells is coupled with S-phase checkpoint defects. *Cell Cycle* **4**, 704–709 (2005).
88. Huang, K., Gao, X. & Wei, W. The crosstalk between Sirt1 and Keap1/Nrf2/ARE anti-oxidative pathway forms a positive feedback loop to inhibit FN and TGF-β1 expressions in rat glomerular mesangial cells. *Exp Cell Res* **361**, 63–72 (2017).
89. Bae, S. H., Sung, S. H., Oh, S. Y., Lim, J. M., Lee, S. K., Park, Y. N., Lee, H. E., Kang, D. & Rhee, S. G. Sestrins Activate Nrf2 by Promoting p62-Dependent Autophagic Degradation of Keap1 and Prevent Oxidative Liver Damage. *Cell Metab* **17**, 73–84 (2013).

90. Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A. & Mayo, M. W. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* **23**, 2369–2380 (2004).
91. Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. & Gu, W. Negative Control of p53 by Sir2 α Promotes Cell Survival under Stress. *Cell* **107**, 137–148 (2001).
92. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev* **56**, 317–333 (1998).
93. Jia, R., Li, Y., Cao, L., Du, J., Zheng, T., Qian, H., Gu, Z., Jeney, G., Xu, P. & Yin, G. Antioxidative, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of resveratrol on oxidative stress-induced liver damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol* **215**, 56–66 (2019).
94. Chen, W.-M., Shaw, L.-H., CHang, P.-J., Tung, S.-Y., Chang, T.-S., Shen, C.-H., Hsieh, Y.-Y. & Wei, K.-L. Hepatoprotective effect of resveratrol against ethanol-induced oxidative stress through induction of superoxide dismutase in vivo and in vitro. *Exp Ther Med* **11**, 1231–1238 (2016).
95. Faghihzadeh, F., Hekmatdoost, A. & Adibi, P. Resveratrol and liver: A systematic review. *J Res Med Sci* **20**, 797–810 (2015).
96. Peiyuan, H., Zhiping, H., Chengjun, S., Chunqing, W., Bingqing, L. & Imam, M. U. Resveratrol Ameliorates Experimental Alcoholic Liver Disease by Modulating Oxidative Stress. *Evid Based Complement Alternat Med* **10**, 1–10 (2017).
97. Hubbard, B. P. & Sinclair, D. A. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 146–154 (2014).
98. Nayagam, V. M., Wang, X., Tan, Y. C., Poulsen, A., Goh, K. C., Ng, T., Wang, H., Song, H. Y., Ni, B., Entzeroth, M. & Stünkel, W. SIRT1 modulating compounds from high-throughput screening as anti-inflammatory and insulin-sensitizing agents. *J Biomol Screen* **11**, 959–967 (2006).
99. Hubbard, B. P., Gomes, A. P., Dai, H., Li, J., Case, A. W., Considine, T., Riera, T. V., Lee, J. E., Sook Yen, E., Lamming, D. W., Pentelute, B. L., Schuman, E. R., Stevens, L. A., Ling, A. J. Y., Armour, S. M., Michan, S., Zhao, H., Jiang, Y., Sweitzer, S. M., Blum, C. A., Disch, J. S., Ng, P. Y., Howitz, K. T., Rolo, A. P., Hamuro, Y., Moss, J., Perni, R. B., Ellis, J. L., Vlasuk, G. P. & Sinclair, D. A. Evidence for a Common Mechanism of SIRT1 Regulation by Allosteric Activators. *Science* **339**, 1216–1219 (2013).
100. Wikimedia Commons: *Resveratrol trans.png*. Dostupné z URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Resveratrol_trans.png> [cit. 14. 6. 2020].
101. BPS Bioscience: *SRT1720*. Dostupné z URL: <<https://bpsbioscience.com/srt1720>> [cit. 14. 6. 2020].

102. Cayman Chemical: *CAY10591*. Dostupné z URL:
<<https://www.caymanchem.com/product/10009797/cay10591>> [cit. 14. 6. 2020].
103. Revollo, J. R., Grimm, A. A. & Imai, S. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Curr Opin Gastroenterol* **23**, 164–170 (2007).
104. Kane, A. E. & Sinclair, D. A. Chapter 6 - Pharmacological Approaches for Modulating Sirtuins. in *Introductory Review on Sirtuins in Biology, Aging, and Disease* (eds. Guarente, L., Mostoslavsky, R. & Kazantsev, A.) London: Academic Press, 2018, 71–81. ISBN 978-0-12-813499-3.
105. Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M. & Ziegler, M. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* **280**, 36334–36341 (2005).
106. Aksoy, P., White, T. A., Thompson, M. & Chini, E. N. Regulation of intracellular levels of NAD: A novel role for CD38. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 1386–1392 (2006).
107. Escande, C., Nin, V., Price, N. L., Capellini, V., Gomes, A. P., Barbosa, M. T., O’Neil, L., White, T. A., Sinclair, D. A. & Chini, E. N. Flavonoid Apigenin Is an Inhibitor of the NAD⁺ase CD38: Implications for Cellular NAD⁺ Metabolism, Protein Acetylation, and Treatment of Metabolic Syndrome. *Diabetes* **62**, 1084–1093 (2013).
108. Hu, J., Jing, H. & Lin, H. Sirtuin inhibitors as anticancer agents. *Future Med Chem* **6**, 945–966 (2014).
109. Gertz, M., Fischer, F., Nguyen, G. T. T., Lakshminarasimhan, M., Schutkowski, M., Weyand, M. & Steegborn, C. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, E2772–E2781 (2013).
110. Ross, F. A., MacKintosh, C. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *FEBS J* **283**, 2987–3001 (2016).
111. Hardie, D. G., Ross, F. A. & Hawley, S. A. AMPK - a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 251–262 (2012).
112. Garcia, D. & Shaw, R. J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Mol Cell* **66**, 789–800 (2017).
113. Yan, Y., Zhou, X. E., Xu, H. E. & Melcher, K. Structure and Physiological Regulation of AMPK. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
114. Hardie, D. G. & Pan, D. A. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* **30**, 1064–1070 (2002).
115. Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J. Y.-J., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Shaw, R. J., Cohen, R. A. & Zang, M. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to

- attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* **13**, 376–388 (2011).
116. Muoio, D. M., Seefeld, K., Witters, L. A. & Coleman, R. A. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* **338**, 783–791 (1999).
 117. Carling, D., Clarke, P. R., Zammit, V. A. & Hardie, D. G. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem* **186**, 129–136 (1989).
 118. Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D. & Hue, L. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* **10**, 1247–1255 (2000).
 119. Koo, S.-H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Sreter, R. A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., Takemori, H. & Montminy, M. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* **437**, 1109–1111 (2005).
 120. Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A. & Viollet, B. Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **50**, 1515–1521 (2001).
 121. Lin, J., Handschin, C. & Spiegelman, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* **1**, 361–370 (2005).
 122. Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12017–12022 (2007).
 123. Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E. P., McBurney, M. W., Sauve, A. A. & Sartorelli, V. Glucose Restriction Inhibits Skeletal Myoblast Differentiation by Activating SIRT1 through AMPK-Mediated Regulation of Nampt. *Dev Cell* **14**, 661–673 (2008).
 124. Chen, X., Li, X., Zhang, W., He, J., Xu, B., Lei, B., Wang, Z., Cates, C., Rousselle, T. & Li, J. Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF-κB pathway. *Metab Clin Exp* **83**, 256–270 (2018).
 125. Mo, C., Wang, L., Zhang, J., Numazawa, S., Tang, H., Tang, X., Han, X., Li, J., Yang, M., Wang, Z., Wei, D. & Xiao, H. The Crosstalk Between Nrf2 and AMPK Signal Pathways Is Important for the Anti-Inflammatory Effect of Berberine in LPS-Stimulated Macrophages and Endotoxin-Shocked Mice. *Antioxid Redox Signal* **20**, 574–588 (2014).

126. Yamada, N., Karasawa, T., Kimura, H., Watanabe, S., Komada, T., Kamata, R., Sampilvanjil, A., Ito, J., Nakagawa, K., Kuwata, H., Hara, S., Mizuta, K., Sakuma, Y., Sata, N. & Takahashi, M. Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure. *Cell Death Dis* **11**, 1–16 (2020).
127. Lee, H., Zandkarimi, F., Zhang, Y., Meena, J. K., Kim, J., Zhuang, L., Tyagi, S., Ma, L., Westbrook, T. F., Steinberg, G. R., Nakada, D., Stockwell, B. R. & Gan, B. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nat Cell Biol* **22**, 225–234 (2020).
128. Li, C., Ming, Y., Wang, Z., Xu, Q., Yao, L., Xu, D., Tang, Y., Lei, X., Li, X. & Mao, Y. GADD45 α alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity by promoting AMPK activation. *Cell Mol Life Sci* **76**, 129–145 (2019).
129. Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J. & Ha, J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med* **48**, e224 (2016).
130. Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* **348**, 607–614 (2000).
131. Dumasia, R., Eagle, K. A., Kline-Rogers, E., May, N., Cho, L. & Mukherjee, D. Role of PPAR- γ agonist thiazolidinediones in treatment of pre-diabetic and diabetic individuals: a cardiovascular perspective. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5**, 377–386 (2005).
132. Zheng, J. & Ramirez, V. D. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol* **130**, 1115–1123 (2000).
133. Vincent, M. F., Bontemps, F. & den Berghe, G. V. Substrate cycling between 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside and its monophosphate in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **52**, 999–1006 (1996).
134. Targonsky, E. D., Dai, F., Koshkin, V., Karaman, G. T., Gyulkhandanyan, A. V., Zhang, Y., Chan, C. B. & Wheeler, M. B. α -Lipoic acid regulates AMP-activated protein kinase and inhibits insulin secretion from beta cells. *Diabetologia* **49**, 1587–1598 (2006).
135. Handa, N., Takagi, T., Saijo, S., Kishishita, S., Takaya, D., Toyama, M., Terada, T., Shirouzu, M., Suzuki, A., Lee, S., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Kadowaki, T., Minokoshi, Y. & Yokoyama, S. Structural basis for compound C inhibition of the human AMP-activated protein kinase α 2 subunit kinase domain. *Acta Crystallogr D* **67**, 480–487 (2011).
136. Dasgupta, B. & Seibel, W. Compound C/Dorsomorphin: Its Use and Misuse as an AMPK Inhibitor. *Methods Mol Biol* **1732**, 195–202 (2018).
137. Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S. C., Alessi, D. R. & Cohen, P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**, 297–315 (2007).

138. Vogt, J., Traynor, R. & Sapkota, G. P. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. *Cell Signal* **23**, 1831–1842 (2011).
139. Farghali, H., Buchar, E., Machková, Z., Kameníková, L. & Masek, K. Muramyl dipeptide and carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: involvement of plasma membrane and calcium homeostasis in protective effect. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **8**, 469–477 (1986).
140. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* **111**, A3.B.1-A3.B.3 (2015).
141. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55–63 (1983).
142. Huang, X.-J., Choi, Y.-K., Im, H.-S., Yarimaga, O., Yoon, E. & Kim, H.-S. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors (Basel)* **6**, 756–782 (2006).
143. Abcam: *Rat Alanine Transaminase ELISA Kit (ab234579)*. Dostupné z URL: <<https://www.abcam.com/rat-alt-elisa-kit-ab234579.html>> [cit. 18. 6. 2020].
144. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275 (1951).
145. Kutinová Canová, N., Martínek, J., Kmoníčková, E., Zídek, Z., Kameníková, L. & Farghali, H. Modulation of Spontaneous and Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Production and Apoptosis by D-Galactosamine in Rat Hepatocyte Culture: The Significance of Combinations of Different Methods. *Toxicol Mech Methods* **18**, 63–74 (2008).
146. Kang, S. W. S., Haydar, G., Taniane, C., Farrell, G., Arias, I. M., Lippincott-Schwartz, J. & Fu, D. AMPK Activation Prevents and Reverses Drug-Induced Mitochondrial and Hepatocyte Injury by Promoting Mitochondrial Fusion and Function. *PLoS One* **11**, 1–24 (2016).
147. Sulfasalazine interference with ultraviolet absorbance in assays. *Reactions Weekly* **1781**, 3–3 (2019).
148. Al Humayed, S., Al-Hashem, F., Haidara, M. A., El Karib, A. O., Kamar, S. S., Amin, S. N. & Al-Ani, B. Resveratrol Pretreatment Ameliorates p53-Bax Axis and Augments the Survival Biomarker B-Cell Lymphoma 2 Modulated by Paracetamol Overdose in a Rat Model of Acute Liver Injury. *Pharmacology* **105**, 39–46 (2020).
149. Wang, Y., Wu, Z., Li, D., Wang, D., Wang, X., Feng, X. & Xia, M. Involvement of Oxygen-regulated Protein 150 in AMP-activated Protein Kinase-mediated Alleviation of Lipid-induced Endoplasmic Reticulum Stress. *J Biol Chem* **286**, 11119–11131 (2011).